

УДК 619
<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-351-7-8-47-50>
Оригинальное исследование/Original research

Горяинова Г.М.,
Арсеньева Л.В.,
Денисова Е.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» Российской академии наук, 123022, г. Москва, Звенигородское ш., д. 5 стр. 1
E-mail: ospvnii@mail.ru

Ключевые слова: антибактериальные препараты, иммуномикрочиповая технология, токсиканты, мониторинг, качество, молочная продукция

Для цитирования: Горяинова Г.М., Арсеньева Л.В., Денисова Е.А. Метод иммуномикрочиповой технологии при контроле антимикробных веществ для мониторинга продукции животноводства. Аграрная наука. 2021; 351 (7-8): 47–50.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-351-7-8-47-50>

Конфликт интересов отсутствует

Galina M. Goryainova,
Louise V. Arsenyeva,
Elizaveta A. Denisova

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, 123022, Moscow, Zvenigorodskoe sh., 5-1
E-mail: ospvnii@mail.ru

Key words: antibacterial drugs, immunomicrochip technology, toxicants, monitoring, quality, dairy products

For citation: Goryainova G.M., Arsenyeva L.V., Denisova E.A. The method of immunomicrochip technology in the control of antimicrobial substances in the monitoring of livestock products. Agrarian Science. 2021; 351 (7-8): 47–50. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-351-7-8-47-50>

There is no conflict of interests

Метод иммуномикрочиповой технологии при контроле антимикробных веществ для мониторинга продукции животноводства

РЕЗЮМЕ

Актуальность. В статье освещена проблема выявления остаточных количеств антимикробных веществ в молочной продукции. Широкое применение лекарственных препаратов в ветеринарии и животноводстве создает определенные проблемы, связанные с возможным загрязнением сырья и продукции остаточными количествами этих веществ в случае несоблюдения ветеринарных правил и норм. На этом основании необходимо проводить контроль за содержанием препаратов в продуктах животноводства. В настоящее время в России применяются микробиологические и физико-химические методы определения антибактериальных веществ.

Методы. Одним из инновационных направлений в данной области являются методы на основе нанобиотехнологии и, в частности, иммуномикрочиповый метод.

Результаты. В ходе исследований были определены оптимальные параметры обнаружения остаточных количеств β-лактамных антибиотиков, антибиотиков других групп и сульфаниламидов в молоке и молочных продуктах методом иммуномикрочиповой технологии.

The method of immunomicrochip technology in the control of antimicrobial substances in the monitoring of livestock products

ABSTRACT

Relevance. The article highlights the problem of detecting residual amounts of antimicrobial substances in dairy products. The widespread use of medicines in veterinary medicine and animal husbandry creates certain problems associated with the possible contamination of raw materials and products with residual amounts of these substances in case of non-compliance with veterinary rules and regulations. On this basis it is necessary to monitor the content of drugs in animal products. Currently, microbiological and physico-chemical methods for the determination of antibacterial substances are used in Russia.

Methods. One of the innovative directions in this field are methods, based on nanobiotechnology and, in particular, the immunomicrochip method. The immunomicrochip technology is designed for simultaneous qualitative and quantitative evaluation of several substances from a single sample.

Results. During the research, the optimal parameters for detecting residual amounts of beta-lactam antibiotics, antibiotics of other groups and sulfonamides in milk and dairy products were determined by the method of immunomicrochip technology.

Поступила: 30 июня
После доработки: 30 июля
Принята к публикации: 10 августа

Received: 30 June
Revised: 30 July
Accepted: 10 August

Введение

Неотъемлемым условием интенсивного развития животноводства является использование лекарственных средств для борьбы с инфекционными заболеваниями животных и повышения их продуктивности, что делает возможным присутствие остаточных количеств этих препаратов в сельскохозяйственной продукции.

Здоровье человека в значительной степени определяется теми продуктами, которые он употребляет в пищу. Не является исключением и молоко — ценный источник питательных веществ. Однако уникальные свойства продукта могут быть испорчены наличием в его составе антибиотиков. Эти препараты, незаменимые при правильном использовании, могут причинить вред организму человека при бесконтрольном их употреблении в пищу [1, 2].

При лечении животных антибиотики вводят внутримышечно или непосредственно в пораженные бактериальными инфекциями доли молочной железы лактирующих животных. Доказано, что введенные антибиотики переходят в молоко в количестве от 10 до 50% используемой дозы в течение 48–72 часов и более после инъекции. Содержание антибиотиков в молоке зависит от дозы, свойств, применяемого препарата, молочной продуктивности и индивидуальных особенностей животного. Тепловая обработка молока незначительно разрушает антибиотики [3, 4].

Использование молока с остатками пенициллина и других препаратов может вызывать дисбактериоз и аллергические реакции у людей с повышенной чувствительностью, а также возникновение у патогенных микроорганизмов резистентности к этим препаратам. Присутствие антибиотиков в молоке даже в небольших количествах подавляет развитие молочнокислых бактерий, применяемых при производстве кисломолочных продуктов. Наиболее чувствительными к антибиотикам являются термофильный стрептококк и лактобациллы; мезофильные лактококки обладают меньшей чувствительностью. В то же время посторонняя патогенная микрофлора (стафилококк, сальмонелла, дизентерийная палочка и др.) менее чувствительна к антибиотикам [5, 6].

С целью профилактики молоко, полученное в течение 5 дней после введения антибиотиков, запрещено сдавать на молочные заводы для переработки.

В конце января 2014 года агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США (FDA, англ. *Food and Drug Administration*), опубликовало отчет о проведении анализа 30 антибиотиков, которые используются как добавки к кормам животных. Оказалось, что большинство из них являются причиной роста инфекционных заболеваний человека [3, 7].

Исходя из анализа литературных данных, можно сделать заключение о необходимости контроля продукции животного происхождения на содержание в ней остаточных количеств антибактериальных препаратов. Поэтому необходима разработка новых методик определения остаточных количеств антибиотиков, позволяющих повысить уровень безопасности пищевой продукции. При мониторинге большого числа проб целесообразно использовать ускоренные и чувствительные методы, такие как иммуномикрочиповая технология [8, 9, 10, 11].

Методика

Иммуномикрочиповая технология предназначена для одновременной качественной и количественной оценки нескольких аналитов по одному образцу. В основе лежит технология Randox Biochip, представляющая

собой твердофазный носитель (биочип) с размещенными на нем в определенном порядке тестовыми зонами, на которых иммобилизованы антитела, специфичные к различным сульфаниламидам и антибиотикам, а также антигельминтным препаратам.

Объектами исследований были выбраны: мягкий творог, мягкое мороженное, коровье молоко, простокваша, мацони, антибактериальные вещества, панели Beta-Lactam Array Plus, Anti Microbial Array I и Anti Microbial Array II.

Результаты

В ходе исследований были определены оптимальные параметры обнаружения остаточных количеств β-лактамов антибиотиков, антибиотиков других групп и сульфаниламидов в молоке и молочных продуктах методом иммуномикрочиповой технологии [5]. С этой целью нами была отработана схема пробоподготовки и последующего анализа образцов молока, определены чувствительность и специфичность данного метода.

Чувствительность тест-систем Beta-Lactam Array Plus, Antimicrobial Array I Ultra и Antimicrobial Array II Plus, определенная нами и заявленная производителем, а также спектр выявляемых с их помощью антимикробных веществ представлены в таблице 1.

Полученные экспериментальные данные позволили нам провести экстраполяцию и теоретически обосновать тождество пределов обнаружения для других веществ.

На следующем этапе в образцы пастеризованного коровьего молока, а также молочных продуктов, взятых из торговой сети, проверенных на отсутствие в них изначально остаточных количеств антибактериальных препаратов по методу ГОСТ 31903-2012, мы вносили различные концентрации антибиотиков, используемых в РФ для лечения различных инфекционных заболеваний КРС, в том числе мастита [9, 1, 12, 13]. Всего было исследовано 38 антибактериальных препаратов, в том числе комплексных, как российских, так и западных производителей. Полученные данные представлены в таблице 2.

В исследованных нами образцах не было обнаружено остаточных количеств антимикробных веществ, что говорит о хорошем качестве исследуемой продукции.

Выводы

Необходимость мониторингового определения большого числа проб на содержание остаточных количеств антибактериальных веществ в молоке и молочной продукции требует разработки методик ускоренного скринингового анализа. Показана перспективность метода на основе метода иммуномикрочипового контроля для выявления остаточных количеств антимикробных веществ в молоке и молочной продукции [2, 13].

Данный метод основан на конкурентном иммуноанализе, что позволяет более точно определять остаточные количества различных веществ в малом диапазоне — в мкг на л/кг продукта.

На основе проведенных исследований были разработаны адаптированные методики определения этих веществ с использованием тест-систем RANDOX.

С помощью панели Antimicrobial Array I Ultra определены пределы обнаружения для данной панели и методики в молочных продуктах, которые составляли от 0,5 до 2,5 мкг/л для различных веществ. В одном образце можно выявлять одновременно 20 антибиотических препаратов и сульфаниламидов.

Таблица 1. Предел обнаружения антибактериальных веществ тест-системами Beta-Lactam Array Plus, Antimicrobial Array I Ultra и Antimicrobial Array II Plus в молоке и молочной продукции

Table 1. Limit of detection of antibacterial substances by Beta-Lactam Array Plus, Antimicrobial Array I Ultra and Antimicrobial Array II Plus test systems in milk and dairy products

Аналиты	Предел обнаружения мкг/л				
	заявленный произво- дителем для молока	экспериментально установленный			
		для коровьего молока	для кисломолочной продукции	для мягкого творога	для мягкого мороженого
Beta-Lactam Array Plus					
Ампициллин	0,8	0,82±0,01	0,80±0,01	0,81±0,01	0,83±0,01
Амоксициллин	0,8	0,88±0,07	0,87±0,07	0,86±0,07	0,89±0,07
Клоксациллин	3,0	3,21±0,03	3,20±0,03	3,21±0,03	3,19±0,03
Диклоксациллин	3,0	3,32±0,07	3,33±0,07	3,30±0,07	3,31±0,07
Оксациллин	3,0	3,18±0,09	3,16±0,09	3,19±0,09	3,17±0,09
Пенициллин G	0,4	0,42±0,05	0,44±0,05	0,41±0,05	0,43±0,05
Пенициллин V	0,4	0,48±0,06	0,47±0,06	0,46±0,06	0,46±0,06
Цефопиразон	5,0	5,23±0,08	5,21±0,08	5,20±0,08	5,22±0,08
Цефкином	0,3	0,32±0,04	0,31±0,04	0,33±0,04	0,34±0,04
Цефалексин	0,3	0,38±0,05	0,37±0,05	0,36±0,05	0,37±0,05
Antimicrobial Array I Ultra					
Сульфадиметоксин	0,6	0,62±0,04	0,63±0,04	0,61±0,04	0,63±0,04
Сульфадиазин	0,5	0,47±0,06	0,46±0,06	0,46±0,06	0,45±0,06
Сульфадоксин	0,5	0,54±0,07	0,55±0,07	0,56±0,07	0,57±0,07
Сульфаметоксазол	0,5	0,46±0,03	0,45±0,03	0,47±0,03	0,48±0,03
Сульфизаксазол	0,5	0,52±0,05	0,51±0,05	0,53±0,05	0,51±0,05
Триметоприм	0,5	0,52±0,04	0,50±0,04	0,53±0,04	0,51±0,04
Дапсон	0,5	0,51±0,01	0,49±0,01	0,50±0,01	0,52±0,01
Antimicrobial Array II Plus					
Хинолоны	1,0	1,09±0,02	1,08±0,02	1,07±0,02	1,09±0,02
Стрептомицин	2,0	2,05±0,02	2,04±0,02	2,03±0,02	2,05±0,02
Тетрациклины	1,0	1,12±0,02	1,14±0,02	1,13±0,02	1,15±0,02
Тиозин	2,5	2,48±0,03	2,46±0,03	2,47±0,03	2,49±0,03
Тиамфеникол	0,5	0,55±0,06	0,56±0,06	0,55±0,06	0,57±0,06
Цефтиофур	1,5	1,56±0,03	1,57±0,03	1,58±0,03	1,55±0,03

Таблица 2. Результаты определения остаточных количеств антимикробных веществ в образцах молочной продукции, взятой в торговой сети

Table 2. Results of determination of residual amounts of antimicrobial substances in samples of dairy products taken in the retail network

№	Образец молока	Beta-Lactam Array Plus	Antimicrobial Array I Ultra	Antimicrobial Array II Plus	Экспресс метод по ГОСТ 31903-2012
1	Молоко бочковое пастеризованное фирмы «ОК» от станции «Барыбино» ЖД (лето)	–	–	–	–
2	Молоко отборное 3,2–6% «Домик в деревне» в бутылке	–	–	–	–
3	Молоко отборное 3,5% «Простоквашино» в бутылке	–	–	–	–
4	Кефир 3,2 «Домик в деревне»	–	–	–	–
5	Простокваша «Простоквашино»	–	–	–	–
6	Творог мягкий 9% «Останкинский»	–	–	–	–
7	Творог мягкий 5% «Данон»	–	–	–	–
8	Мацони 3,2% «Ростагроэкспорт»	–	–	–	–
9	Мороженое мягкое из розничной сети	–	–	–	–
«+» наличие остаточных количеств антибиотиков; «–» отсутствие остаточных количеств антибиотиков.					

С помощью панели Antimicrobial Array II Plus одновременно выявляли остаточные количества 35 антибиотических препаратов, в том числе 10 видов тетрациклина и 17 хинолоновых соединений. Пределы обнаружения составляли от 0,5 до 2,5 мкг/л.

С помощью панели Beta-Lactam Array Plus, определены в одном образце остаточные количества одновременно 13 β -лактамных антибиотиков (пенициллины и цефалоспорины). Предел обнаружения составлял от 0,3 до 6,0 мкг/л.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Прокопенко С.Т., Дмитриченко М.И., Еремина М.А. Факторы, определяющие качество пищевой продукции. Техничко-технологические проблемы сервиса. 2012; 3 (21): 81-85. [Prokopenko S. T., Dmitrichenko M. I., Eremina M. A. Factors determining the quality of food products. Technical and technological problems of the service. 2012; 3 (21): 81-85. (In Russ.)].
2. Stolker A.A.M., Brinkman U.A.Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs growth-promoting agents in food-producing animals a review. J. Chromotogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sei. 2005. Vol. 1067 : P. 15-53.
3. Игнатенко А.В. Биотестирование антибиотиков в мясомолочной продукции. Труды БГТУ. Сер. IV. Химия и технология орган. 2005; Вып. XIII: 87-89. [Ignatenko A.V. Biotesting of antibiotics in meat and dairy products. Proceedings of BSTU. Ser. IV. Chemistry and Technology organ. 2005; Issue XIII: 87-89. (In Russ.)].
4. Wenhua Zh., Xu Xu, Erhua W. Direct chiral separation of caderofloxacin enantiomers by HPLC using glucoprotein column. Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61; 11: 1182–1184.
5. Калинин А.Я. Актуальные проблемы защиты потребительского рынка от фальсифицированной, опасной и некачественной продукции в русле концепции Правительства РФ «Политика здорового питания в России». Сб. трудов 7-го всероссийского конгресса «Здоровое питание населения России» Москва. 2003: 220-223. [Kalinin A.Ya. Actual problems of protecting the consumer market from counterfeit, dangerous and low-quality products in line with the concept of the Russian Federation "Policy of healthy eating in Russia." Sat. Proceedings of the 7th All-Russian Congress "Healthy Nutrition of the Population of Russia" Moscow. 2003: 220-223. (In Russ.)].
6. Danaher M., Howells L.C., Crooks S.R., Cerkvenik-Fläjs V., O'Keeffe M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. J. Chromatogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sei. 2006. Vol. 844: P. 175-203.
7. Соколова Л.И., Черняев А.П. Определение бензилпенициллина, левометицина и тетрациклина в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Журнал аналитической химии. 2001. Т. 56; 11: 1177-1180. [Sokolova L. I., Chernyaev A. P. Determination of benzylypenicillin, levomycetin and tetracycline in food products by high-performance liquid chromatography. Journal of Analytical Chemistry. 2001; 11: 1177-1180. (In Russ.)].
8. Бабунова В.С., Горяинова Г.М., Арсеньева Л.В., Денисова Е.А. Сравнительная оценка методов выявления кокцидиостатиков в объектах ветеринарного надзора. Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2019; 3 (31): 255-259. [Babunova V. S., Goryainova G. M., Arsenyeva L. V., Denisova E. A. Comparative evaluation of methods

for detecting coccidiostatics in objects of veterinary supervision. Russian Journal of Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology. 2019; 3 (31): 255-259 (In Russ.)].

9. Бабунова В.С., Денисова Е.А., Горяинова Г.М., Арсеньева Л.В., Светличкин В.В. Иммуномикрочиповая технология для эффективного контроля токсикантов в объектах ветеринарного надзора: достижения и перспективы. Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2016; 4 (20): 11-15. [Babunova V.S., Denisova E.Ar., Goryainova G.M., Arsenyeva L.V., Svetlichkin V.V. Immunomicrochip technology for effective control of toxicants in veterinary surveillance facilities: achievements and prospects. Russian Journal of Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology. 2016; 4 (20): 11-15. (In Russ.)].

10. Попов П.А., Бабунова В.С., Осипова И.С., Лавина С.А., Денисова Е.А., Горяинова Г.М., Арсеньева Л.А. Методы ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов убоя животных на остаточные количества лекарственных веществ в составе кормовых добавок. Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2019; 3 (31): 272-281. [Popov P.Al., Babunova V.S., Osipova I.S., Lavina S.A., Denisova E.Ar., Goryainova G.M., Arsenyeva L.V. Methods of veterinary and sanitary examination of animal slaughter products for residual amounts of medicinal substances in feed additives. Russian Journal of Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology. 2019; 3 (31): 272-281. (In Russ.)].

11. Koesukwiwat U., Jayanta S., Leepipatpiboon N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk. J. Chromatogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sei. 2006. Vol. 1149: P. 102 - 111.

12. Денисова Е.А., Бабунова В.С., Светличкин В.В. Ускоренные методы контроля остаточных количеств запрещенных и вредных веществ в сырье и продуктах животного происхождения. Ветеринария и кормление. 2014; 3: 26-27. [Denisova E. Ar., Babunova V.S., Svetlichkin V.V. Accelerated methods of control of residual amounts of prohibited and harmful substances in raw materials and animal products. Veterinary medicine and feeding. 2014; 3: 26-27. (In Russ.)].

13. Бабунова В.С., Денисова Е.А., Горяинова Г.М., Арсеньева Л.В. Чувствительность метода иммуномикрочиповой технологии при определении остаточных количеств стимуляторов роста (гормональных препаратов) в мясе продуктивных животных. Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2019; 4 (32): 359-364. [Babunova V.S., Denisova E.Ar., Goryainova G.M., Arsenyeva L.V. Sensitivity of the method of immunomicrochip technology in determining the residual amounts of growth stimulants (hormonal drugs) in the meat of productive animals. Russian Journal of Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology. 2019; 4 (32): 359-364. (In Russ.)].