

Система контроля ветеринарных препаратов и лекарственных веществ в молочном сырье на мультифункциональном приборе

Анна Андреевна Криницына, аспирант
Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)
E-mail: anna.krinityna@pepsico.com

Разработан и валидирован мультиклассовый метод экспресс-диагностики остаточных количеств ветеринарных препаратов и лекарственных веществ в молочном сырье. В сыром молоке, сухом цельном и обезжиренном молоке, подсырной сыворотке за 10 мин на приборе «Extenso» методом биочипов можно определить 120 ветеринарных препаратов и токсинов, выделенных в 17 специфических групп, таких как β -лактамы, тетрациклины, аминогликозиды, линкозамиды, макролиды, (фтор)хинолоны, сульфаниламиды, хлорамфениколы, триметопримы, колистины, меламины, афлатоксины. Простая и быстрая пробоподготовка, основанная на использовании мультиплексной тест-полоски в сочетании с устройством, интегрированным с мощным сервером данных, является основным преимуществом метода. Валидация проводилась в соответствии с требованиями, изложенными в Решении Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. № 28. Метод позволяет обнаруживать остатки антибиотиков в очень низких концентрациях.

Ключевые слова: антибиотики, методы определения, ветеринарные препараты, лекарственные вещества, молочное сырье.

Krinityna A.A. The system for monitoring veterinary drugs and drugs in raw milk on the multifunctional device Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH)

A multiclass method for the express diagnostics of residual amounts of veterinary drugs and medicinal substances in the raw milk Extenso was developed and validated to determine 90 types of antibiotics and toxins isolated into 17 specific groups, such as β -lactams, tetracyclines, aminoglycosides, lincosamides, macrolides, (fluoro) quinolones, sulfonamides, chloramphenicol, trimethoprim, colistin, melamine, aflatoxins, in whole milk, milk powder, whey powder and whey protein concentrate. Simple and fast sample preparation based on a multiplex test strip in combination with a device that is integrated with a powerful data server is the main advantage of the validated method. The validation of the method was carried out in accordance with the requirements set out in the Decision of the Board of the Eurasian Economic Commission dated February 13, 2018 № 28. The method allows the detection of residues at very low concentrations.

Key words: antibiotics, determination methods, veterinary preparations, medicinal substances, raw milk.

С момента появления в 1930-х годах антибиотики использовались в основном для лечения или профилактики заболеваний человека и животных. В дополнение к терапевтической ценности в 1950 г. была подтверждена способность таких препаратов улучшать рост и эффективность кормления сельскохозяйственных животных. Это привело к широкому использованию антибиотиков в качестве кормовых добавок [1].

Очевидно, что одним из существенных последствий применения высоких доз антибиотиков в сельском хозяйстве, в частности в производстве молока, является наличие их остатков в продуктах переработки [2]. Остатки антибиотиков в пищевых продуктах могут оказывать неблагоприятное воздействие на человека в результате непосредственной токсичности, влияния на системы органов или формирования антибиотикоустойчивой микрофлоры [3]. Во многих эпидемиологических исследованиях утверждается, что воздействие антибиотиков в раннем возрасте через пищевую цепочку или питьевую воду и вертикальная передача от матери связаны с повышенным риском детского ожирения [4, 5]. Кроме того, прямо или косвенно доказаны другие потенциальные неблагоприятные эффекты остатков антибиотиков на человека, такие как аллергические реакции, нарушение функций пищеварительной системы и хронические токсические эффекты.

Для предотвращения вредного воздействия малых доз противомикробных препаратов, попадающих в организм с пищевыми продуктами, необходим контроль остаточного содержания антибиотиков в молоке. Цель исследования — изучение системы контроля ветеринарных препаратов и лекарственных веществ в молочном сырье на инновационном мультиплексном приборе методом биочи-

пов. В качестве сырья использовали сырое и сухое молоко, подсырную сыворотку.

Безопасность сырья анализировали в соответствии с требованиями ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции». Физико-химические показатели определяли по ГОСТ 31449–2013 «Молоко коровье сырое», ГОСТ 34352–2017 «Сыворотка молочная — сырье», ГОСТ 33629–2015 «Консервы молочные. Молоко сухое».

Первый этап включал подготовку проб. В пробирку вместимостью 15 см³ помещали 0,50±0,01 г молока сухого, добавляли 9,00±0,01 г теплой (40±2 °С) дистиллированной воды, не содержащей антибиотиков, и аккуратно перемешивали, не допуская образования пены. Сыворотку подсырную смешивали с дистиллированной водой в пропорции 1,5/8,5, нагревали на водяной бане до 40 °С и нейтрализовали NAOH до содержания сухих веществ 7–8 %. Пробу сырого молока (10±0,01 мл) помещали в пробирку вместимостью 15 см³ и аккуратно перемешивали.

Следующий этап — подготовка тест-системы к проведению измерений. Перед применением тест-систему доставали из холодильника и выдерживали при комнатной температуре не менее 30 мин. Флаконы с реагентами, входящие в тест-систему, перемешивали, аккуратно встряхивая. На всех этапах измерений воздействие прямого солнечного света не допускалось. При использовании полуавтоматического иммунохимического анализатора биочипов реактивы добавляли при помощи пипетирования по направлению к переднему краю биочипа. Для каждого реагента применяли отдельный наконечник пипет-дозатора. Растворы наносили на биочипы осторожно, не касаясь наконечником пипет-дозатора поверхности биочипа.

Таблица 1

Антибиотик	Чувствительность анализатора, мг/кг	Максимально допустимый уровень остатков согласно Решению № 28, мг/кг
Бета-лактамы-пенициллины		
Амоксициллин	3	4
Ампициллин	4	4
Бензилпенициллин (Пен G)	2	<4
Феноксиметилпенициллин (Пен V)	4	–
Клоксациллин	12	30
Нафциллин	350	30
Диклоксациллин	8	30
Оксациллин	16	30
Пенетамат	55	–
Пиперациллин	0,5–1	–
Тикарциллин	10–15	–
Аспоксициллин	1–2	–
Сульбактам	100–1000	–
Тазобактам	1000	–
Бета-лактамазные ингибиторы		
Клавулановая кислота	>20000	200
Бета-лактамы-цефалоспорины		
Цефалониум	3	20
Цефазолин	9	<5000
Цефоперазон	3	50
Цефкином	14	20
Цефтиофур	8	100
Дезфлуорилцефтиофур	60	100
Цефепим	4	10
Дезацетилцефепим	16	10
Цефазетрил	9	125
Цефтизоксим	200	–
Цефуросим	90	–
Цефтриаксон	6	–
Цефалексин	4	100
Цефадроксил	4	–
Фениколы		
Хлорамфеникол – левомецетин	0,15–0,25	0,3
Полимиксины		
Колистин	30	50
Аминогликозиды		
Гентамицин (C1, C1a, C2, C2a)	2–5	100
Сисомицин	175	–
Канамицин А	1	150
Неомицин В	1000	1500
Фрамицетин	–	1500
Апрамицин	125	–
Дигидрострептомицин	50–100	<200
Стрептомицин	50–100	<200
Макролиды		
Эритромицин	30	40
Рокситромицин	700	–
Спирамицин	100	200
Неоспирамицин	100	200
Тилозин А	2–5	50
Десмикозин (Тилозин В)	2–5	–
Тилмикозин	2–5	50

Микотоксины		
Афлатоксин М1	0,4	–
Афлатоксин В1	0,5	–
Линкозамиды		
Линкомицин	3–5	150
Клиндамицин	1–3	150
Пирлимицин	15–25	100
Сульфаниламиды		
Сульфадиазин	3	25
Сульфамеразин	1	25
Сульфадиметоксин	5	25
Сульфаметазин	1	25
Сульфаметоксазол	100	25
Сульфаквиноксалин	4	25
Сульфамонетоксин	2	25
Сульфаметоксипиридазин	1	25
Сульфазотоксипиридазин	<25	25
Сульфасалазин	115	25
Сульфипиридин	1	25
Сульфохлоропиридазин	8	25
Сульфатуанидин	7	25
Сульфатиазол	3	25
Сульфасоксазол	<25	25
Сульфаметизол	150	25
Сульфаметер	2	25
Сульфамоксол	1	25
Производные пиримидина		
Баквиприм	25–35	30
Триметоприм	1–2	50
Тетрациклины		
Тетрациклин	9	<10
Хлортетрациклин	5	<10
Окситетрациклин	9	<10
Доксициклин	3	<10
Миноциклин	<50*	–
Демеклоциклин	<50*	–
Санциклин	<50*	–
Амициклин	<50*	–
Меклоциклин	<50*	–
Метациклин	<50*	–
Хинолоны		
Данофлоксацин	14	30
Энрофлоксацин	14	100 в сумме
Ципрофлоксацин	16	100 в сумме
Пефлоксацин	10–15	100
Офлоксацин	10–15	100 в сумме
Марбофлоксацин	14	75
Дифлоксацин	16	–
Норфлоксацин	20	100 в сумме
Энофлоксацин	<20	–
Ломелофлоксацин	<30	–
Орбифлоксацин	>100	–
Сарафлоксацин	16	–
Флумеквин	25	50
Оксолиновая кислота	125	–
Налидиксовая кислота	150	–
Циноксацин	<1000	–
Флероксацин	<50	–
Пипемидиновая кислота	>10000	–
Пиромидиновая кислота	>10000	–
Левовлоксацин	<1	<1

*Ниже предела чувствительности метода.

Таблица 2

Образец	Обнаруженное соединение	
	Название	Содержание, мг/кг
Молоко пастеризованное для промышленной переработки с массовой долей жира 3,7 %	Афлатоксин М1	0,7
Подсырная сыворотка	Тетрациклин	0,26
	Тилозин	0,1
Сухое цельное молоко	Тетрациклин	0,1
Сухое обезжиренное молоко	Стрептомицин	1,0
	Тетрациклин	0,4

При выполнении измерений в лаборатории необходимо соблюдать следующие условия: температура окружающего воздуха от 18 до 27 °С; относительная влажность воздуха 50±30 %; атмосферное давление 96±10 кПа.

Пробу с погруженной в нее тест-полоской инкубировали в течение 10 мин при 30 °С. Затем тест-полоски вносили в кассету с биочипом. Анализатор выявляет 120 ветеринарных препаратов и токсинов, выделенных в 17 специфических групп, таких как β-лактамы, тетрациклины, аминогликозиды, линкозамиды, макролиды, (фтор)хинолоны, сульфаниламиды, хлорамфениколы, триметопримы, колистины, меламины, афлатоксины (табл. 1).

Мультифункциональная платформа позволяет определить остаточные уровни 98 веществ из перечня Решения Коллегии ЕЭК № 28 «О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции

животного происхождения, в том числе в сырье, и методах их определения». Результаты исследования сырого и сухого молока, подсырной сыворотки представлены в табл. 2.

Для ветеринарных лабораторий и молокоперерабатывающих предприятий наряду с организацией выездных аудитов сырьевых зон необходим доступный и максимально удобный контроль чистоты товарного молока, поступающего на переработку. Современное цифровое решение при должном ответственном отношении производителей и переработчиков молока позволяет отслеживать выведение антибиотиков из организма коров молочных пород, а значит, максимально эффективно контролировать проблему антибиотикорезистентности. 

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Kirchhelle, C.** *Pharming animals: A global history of antibiotics in food production (1935–2017)*/ C.Kirchhelle// *Nature*. 2018. V. 4(1). P. 1–13.
2. **Liu, X.** *Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture*/ X.Liu, J.C.Steele, X.-Z.Meng// *Environmental Pollution*. 2017. V. 223. P. 161–169.
3. **Rhoads, J.** *Guidance on the Use of Antibiotics in the Production of Animals for Food*. Food and Drug Administration (FDA)/ J.Rhoads. – Silver Spring, MD, 2015.
4. **Ajslev, T.** *Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: The role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics*/ T.Ajslev [et al.]// *International Journal of Obesity*. 2013. V. 35 (4). P. 522–529.
5. **Blustein, J.** *Association of caesarean delivery with child adiposity from age 6 weeks to 15 years*/ J.Blustein [et al.]// *International Journal of Obesity*. 2013. V. 37 (7). P. 900– 906.