

УДК 619:614.48

06.02.02 - Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки)

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ

Попов Петр Александрович
Кандидат биологических наук,
Ведущий научный сотрудник
E-mail: popov.petr18@gmail.com
ВНИИВСГЭ - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Звенигородское ш. 5, Москва, 123022, Россия

Бутко Михаил Павлович
Доктор ветеринарных наук, профессор Научный консультант
ВНИИВСГЭ - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Звенигородское ш. 5, Москва, 123022, Россия

Лавина Светлана Алексеевна
Доктор биологических наук, Ведущий научный сотрудник
ВНИИВСГЭ - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Звенигородское ш. 5, Москва, 123022, Россия

Тимофеева Ирина Владимировна
Младший научный сотрудник
ВНИИВСГЭ - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Звенигородское ш. 5, Москва, 123022, Россия

Лемясева Светлана Васильевна
Кандидат биологических наук,
Научный сотрудник
ВНИИВСГЭ - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Звенигородское ш. 5, Москва, 123022, Россия

Нетичук Светлана Сергеевна
Младший научный сотрудник
ВНИИВСГЭ - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Звенигородское ш. 5, Москва, 123022, Россия

Важной проблемой отечественной молочной промышленности является наличие остаточных количеств антибиотиков в молоке и молочной продукции которая является актуальной. Антибиотики снижают сортность молока и приводят к нарушениям в технологических

UDC 619:614.48

06.02.02 Veterinary Microbiology, Virology, epizootology, Mycology with mycotoxicology and immunology (veterinary sciences)

METHODS FOR DETECTING RESIDUAL CONCENTRATIONS OF ANTIBIOTICS IN MILK

Popov Petr Alexandrovich
Candidate in Biological Sciences, Leading Researcher
E-mail: popov.petr18@gmail.com
VNIIVSGE branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution FSC VIEW RAS named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS, Zvenigorodskoe shosse 5, Moscow, 123022, Russia

Butko Mikhail Pavlovich
Doctor of Veterinary Science, Scientific consultant
VNIIVSGE branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution FSC VIEW RAS named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS, Zvenigorodskoe shosse 5, Moscow, 123022, Russia

Lavina Svetlana Alekseevna
Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher
VNIIVSGE branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution FSC VIEW RAS named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS, Zvenigorodskoe shosse 5, Moscow, 123022, Russia

Irina Timofeeva Vladimirovna
Junior Researcher
VNIIVSGE branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution FSC VIEW RAS named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS, Zvenigorodskoe shosse 5, Moscow, 123022, Russia

Lemyaseva Svetlana Vasilievna
Candidate in Biological Sciences, Researcher
VNIIVSGE branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution FSC VIEW RAS named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS, Zvenigorodskoe shosse 5, Moscow, 123022, Russia

Netichuk Svetlana Sergeevna
Junior Researcher
VNIIVSGE branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution FSC VIEW RAS named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS, Zvenigorodskoe shosse 5, Moscow, 123022, Russia

An important problem of the domestic dairy industry is the presence of antibiotic residues in milk and dairy products, which is relevant. Antibiotics reduce the grade of milk and lead to disruptions in the technological processes of its processing into fermented milk products, disrupting the

процессах его переработки в кисломолочные продукты, нарушая микробиологические процессы сквашивания. Молоко и молочные продукты служат важными продуктами питания для всех возрастных групп населения. Молоко занимает особую роль в функциональном питании детей дошкольного и школьного возраста. Однако антибиотики, применяющиеся для лечения животных, нередко попадают в пищу человеку, создавая риск для здоровья, поскольку и сами препараты, и их метаболиты могут содержаться в молоке и молочных продуктах при несоблюдении правил применения. Быстрое тестирование наличия остаточных количеств антибиотиков в сыром молоке стало основной задачей для фермеров и перерабатывающих предприятий молочной промышленности

Ключевые слова: МОЛОКО, МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ, ОСТАТОЧНЫЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТИБИОТИКОВ, БИОЧИПОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

microbiological fermentation processes. Milk and dairy products serve as important food items for all age groups. Milk plays a special role in the functional nutrition of preschool and school children. However, antibiotics used to treat animals often enter human food, posing a health risk, since both the drugs themselves and their metabolites can be contained in milk and dairy products if the rules of use are not followed. Rapid testing for antibiotic residues in raw milk has become a major challenge for farmers and dairy processors

Keywords: MILK, DAIRY PRODUCTS, RESIDUAL ANTIBIOTICS, BIOCHIP TECHNOLOGY

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-163-010>

Введение

Молоко и молочные продукты считаются продуктами здорового питания, а входящие в их состав питательные вещества являются сбалансированными и находятся в легкоусвояемой форме. Молочные продукты содержат необходимые питательные вещества для всех возрастных групп и представляют собой важную часть повседневного питания. Однако применение антибиотиков для лечения продуктивных животных, при несоблюдении инструкции по их применению, создает риск попадания остаточных количеств антибиотиков в пищу человека [1.2.5.7.].

На сегодняшний день производители кормовых добавок постоянно расширяют и улучшают свой ассортимент. При этом делается упор на высокую питательность, энергетическую ценность, витаминный и минеральный состав кормовых добавок. Часто они содержат лекарственные вещества, в том числе и кормовые антибиотики, для профилактики различных заболеваний. Кормовые биодобавки получают из определенных видов растительного, животного, бактериального или

<http://ej.kubagro.ru/2020/09/pdf/10.pdf>

минерального сырья химическими или биологическими способами [3.4.6.8.].

Производство молока высокого качества должно соответствовать санитарно-гигиеническим нормам и требованиям перерабатывающих предприятий. Крупные молокоперерабатывающие предприятия уделяют особое внимание показателям безопасности и принимают молоко с учетом и традиционных показателей, и ряда других требований. Для обеспечения безопасности молока и молочных продуктов используется ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», утверждённый решением комиссии Таможенного союза 9 декабря 2011 года, и ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции», утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 года, в которых устанавливаются правила, формы оценки и подтверждения соответствия молока и молочной продукции требованиям закона.[10.11]

Особую опасность для молока представляют различные ингибирующие вещества, особенно остаточные количества антибиотиков. Согласно ГОСТ 23454-2016 ингибирующими веществами являются «любые вещества в молоке, которые независимо от их природы, тормозят или препятствуют развитию микроорганизмов». При употреблении такой продукции в пищу в организме человека развиваются различные аллергические реакции, дисбактериоз, и что самое страшное устойчивость к их воздействию. Так же наличие антибиотиков в молоке представляет опасность для молочной промышленности и приводит к серьёзным экономическим потерям, так как при снижении жизнеспособности заквасочной микрофлоры происходит нарушение технологических процессов производства молочных продуктов. [1.2.7]

Основными антибиотиками-ингибиторами являются бета-лактамы (это пенициллин, амоксициллин, ампенициллин, цефтифул, цефапирин,

клоксациллин, диклоксациллин, оксациллин); тетрациклины (тетрациклин, окситетрациклин); сульфамиды (сульфадиазин, сульфаметазин); микролиды (тилозин, спирамицин, эритромицин); аминогликоциды (гентамицин, неомицин); а так же триметоприм, дапзон и т.п.

Для защиты потребителей в РФ введены строгие законодательные нормы, касающиеся лечения животных антибиотиками, и определены максимальные предельные значения остаточных количеств в продуктах животного происхождения, в том числе молоке и молочных продуктах. Эти значения приведены в Техническом регламенте Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013).

В настоящее время тестированию на предмет выявления остатков различных антибиотиков подлежит каждая партия молока, поступающая на реализацию и переработку. Обеспечение качества и безопасности молока стало одной из главных задач для отечественной молочной промышленности. В настоящее время для определения ингибирующих веществ, в том числе антибиотиков, в молоке пользуются ГОСТ 23454-2016 «Молоко. Методы определения ингибирующих веществ». Этот метод основан на выявлении развития в молоке чувствительной тест-культуры *Streptococcus thermophilus* (шт. В19) и восстановлении резазурина окислительно-восстановительными ферментами, выделяемыми в молоко микроорганизмами. По изменению или не изменению окраски резазурина визуально оценивают отсутствие/наличие ингибирующих веществ в молоке:

- при отсутствии в молоке ингибирующих веществ тест-культура *Streptococcus thermophilus* (шт. В19) развивается и цвет пробы меняется с серо-сиреневого на сиреневый с розовым оттенком или розовый, вплоть до белого;

- при наличии в молоке ингибирующих веществ тест-культура *Streptococcus thermophilus* (шт. В19) не развивается либо ее развитие задерживается, а цвет пробы остается серо-сиреневым или сиреневым.

Чувствительность метода позволяет обнаружить в молоке массовую концентрацию, мг/дм³: пенициллина – 0,004, стрептомицина – 10, тетрациклина – 1, левомицетика – 5,0, массовую долю, %: активного хлора – 0,06, пероксида водорода – 0,005, надуксусной кислоты – 0,005, сульфонола – 0,15, формалина – 0,004.

Для дифференцирования конкретного антибиотика и количественного определения применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

Хотя данные методы исследования считаются достаточно быстро выполнимыми, для их проведения требуется 3...24 ч. Тест-культуру *Streptococcus thermophilus* (шт. В19), используемую в тестах, следует постоянно контролировать, чтобы убедиться, что она остается чистой, так как в процессе высева на обезжиренное молоко возможен занос сторонней микрофлоры. Результаты теста достаточно субъективны, могут привести к ложноотрицательному или ложноположительному заключению, кроме того, по результатам теста нельзя определить количество того или иного ингибирующего вещества. Присутствие природных ингибиторов в аномальном молоке может быть причиной ложноположительных результатов [4–6].

В настоящее время существуют различные «быстрые тесты», основанные либо на иммуноанализе, либо на ферментативной реакции, доступные для скрининга ряда остатков антибиотиков в молоке. Эти тесты специфичны для конкретного класса антибиотиков, результат может быть получен в течение 30 мин.

Хроматография наиболее надежна и является арбитражным методом количественного определения остатков антибиотиков. В настоящее время

более 80% аналитических методов определения ветеринарных лекарственных средств основана на высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-селективной спектрометрией (ВЭЖХ/МС). Однако данный метод требует дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала. Кроме того, методы ВЭЖХ требуют сложной пробоподготовки, а также экстракции анализируемого соединения из образцов.

В последние года все чаще используются биосенсоры. Применение биосенсоров позволяет селективно детектировать конкретные соединения в молоке и молочных продуктах без сложной пробоподготовки, с минимальной обработкой образцов. Биосенсоры – это компактные устройства, передающие селективное биохимическое распознавание в измеримый физический сигнал, который можно перевести в свидетельство безопасности, или качества, молока. Биодатчики содержат элементы сигнальной трансдукции. Биодатчики предлагают возможность разработки быстрых и портативных устройств для анализа в реальном времени в сложных матрицах, работающих полностью автоматически или вручную, поэтому пользователю не требуются специальные навыки. В настоящее время большинство биосенсорных методов сосредоточены на выявлении отдельных групп антибиотиков, но существуют также исследования, касающиеся одновременного определения различных групп антибиотиков.

Биодатчики на основе рецепторов и ферментов. В биосенсорах специфические рецепторы или ферменты используют для генерации реакции распознавания, сигнал детектируют с помощью подходящего преобразователя. Биодатчики на основе рецепторов/ферментов обычно используют принципы оптического или электрохимического детектирования сигнала

Микробные биодатчики. Существует несколько биосенсоров для обнаружения остатков антибиотиков в молоке на основе учета

ферментативной активности некоторых микроорганизмов. Микробные биосенсоры основаны на измерении ингибирования роста бактерий в присутствия антибиотиков.

Иммуносенсоры. Самая большая группа биосенсоров, используемых для обнаружения остатков антибиотиков в молоке, основана на использовании иммунохимических реакций биоудаления. Наиболее часто применяются иммуносенсоры электрохимические и оптические, последние чаще всего являются биодатчиками SPR. Хотя иммуносенсоры очень селективны, скорость анализа зависит от срока инкубации, необходимого для образования комплекса антиген–антитело. Кроме того, полная регенерация датчика также может занять достаточно много времени.

Аптасенсоры. Для обнаружения остатков антибиотиков в молоке за последние 5 лет были разработаны биосенсоры на основе аптамеров (аптасенсоры). Аптамеры можно рассматривать как химические, или «синтетические», антитела из-за их продуцирования *in vitro* на основе систематической эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения. Этот процесс позволяет изготавливать аптамеры также для неиммуногенных и токсичных мишеней, которые не могут быть получены естественными иммунными системами. Аптамеры достаточно стабильны, и на них не влияют незначительные изменения температуры или pH. При оптимальных условиях они могут восстановить свою первоначальную конформацию.

Датчики молекулярного импринтирования полимера (MIP). В последние годы для биосенсорного выявления остатков антибиотиков в молоке применяют молекулярно-отпечатанные полимерные датчики. Молекулярный отпечаток представляет собой метод создания синтетических материалов, содержащих специфичные рецепторы, имеющие высокое сродство к молекуле-мишени. Молекулярно-импринтные полимеры (MIP) представляют собой сшитые органические структуры, содержащие заранее разработанные сайты молекулярного

распознавания, комплементарные по форме, размеру и функциональным группам молекуле матрицы. МІР являются эффективной альтернативной природным рецепторам в биотестировании.

Выводы

Доходы производителей молока напрямую зависят от потерь при его реализации в случаи нарушений со стороны сортности, качества. Наличие ингибирующих веществ является одним из таких факторов. Очень важно быстро определять широкий спектр токсикантов, в том числе антибактериальных препаратов. Метод определения ингибирующих веществ с использованием тест-культуры термофильного стрептококка и индикатора резазурина доступен, прост, имеет низкую стоимость при большой производительности. Согласно полученным нами данным метод с высокой чувствительностью определяет не только заявленные в ГОСТе 23454–2016 антибиотики, но и другие группы- такие как аминоклиозиды, фениколы, линкозамиды и др.

Биодатчики, предложенные для этих антибиотиков, часто имеют пределы обнаружения ниже или равные разрешенным максимальным уровням их остаточных содержаний в молоке и молочной продукции. За последнее десятилетие было проведено множество исследований биодатчиков с целью определить специфичность и предел обнаружения антибиотиков в молоке.

Некоторые биосенсорные системы с высокой чувствительностью требуют дополнительной предварительной обработки образцов молока и молочной продукции для удаления жира и белков, однако среднее время обнаружения составляет 30...40 мин или до 2 ч в случае, если требуется более длительная пробоподготовка, однако биосенсорные методы являются более быстрыми в сравнении с классическими методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Светличкин В.В., Бабунова В.С., Ярова О.А. и др. Определение остаточных количеств антимикробных веществ в сырье и пищевых продуктах с помощью иммуномикрочипового метода // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2011. – №2(6). – С. 27-29.
2. Светличкин В.В., Денисова Е.А., Бабунова В.С. и др. Применение иммуномикрочиповой технологии для определения остаточных количеств лекарственных средств в объектах ветеринарно-санитарного контроля // Вестник технологического университета. – 2017. – Т. 20. – №18. – С. 121-122.
3. Бутко М.П., Попов П.А., Лавина С.А. и др. Методические подходы к ветеринарно-санитарной экспертизе продуктов убоя сельскохозяйственных животных при инвазионных болезнях // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2018. – №1(25). – С. 10-17.
4. Бабунова В.С., Попов П.А., Осипова И.С. Проблема классификации кормовых добавок, используемых в рационе продуктивных животных // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2020. – №1(33). – С. 12-16.
5. Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.В., Онищенко Д.А. Фальсификация продукции животного происхождения // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2017. – №3(23). – С. 17-23.
6. Мкртумян А.В., Бутко М.П., Попов П.А. и др. Математическая модель динамики гибели микроорганизмов под действием поражающих факторов // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2017. – №2(22). – С. 59-62.
7. Babington R., Matas S., Marco M.P., Galve R. Current bioanalytical methods for detection of penicillins // Analytical and Bioanalytical Chemistry 2012; 403, 1549–1556.
8. Chafer-Pericas C., Maquieira A., Puchades R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples // Trends in Analytical Chemistry 2010; 29, 1038-1049.
9. Попов П.А., Бабунова В.С., Осипова И.С. и др. 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). – С. 272-280.
10. Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.В., Онищенко Д.А. Стимуляторы роста животных и их применение в животноводстве // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2017. – №4(24). – С. 14-20.
11. Бутко М.П., Герасимов А.С. и др. Ветеринарно-санитарные требования по обеспечению безопасности производства мяса и мясопродуктов. – М.: Издательский дом «Научная библиотека», 2017.

LITERATURA

1. Svetlichkin V.V., Babunova V.S., Yarova O.A. i dr. Opredelenie ostatechny`x kolichestv antimikrobnuy`x veshhestv v sy`r'e i pishhevy`x produktax s pomoshh`yu immunomikrochipovogo metoda // Rossijskij zhurnal «Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigiyeny` i e`kologii». – 2011. – №2(6). – S. 27-29.
2. Svetlichkin V.V., Denisova E.A., Babunova V.S. i dr. Primenenie immunomikrochipovoj tehnologii dlya opredeleniya ostatechny`x kolichestv lekarstvenny`x sredstv v ob`ektax veterinarno-sanitarnogo kontrolya // Vestnik texnologicheskogo universiteta. – 2017. – T. 20. – №18. – S. 121-122.
3. Butko M.P., Popov P.A., Lavina S.A. i dr. Metodicheskie podxody` k veterinarno-sanitarnoj e`kspertize produktov uboaya sel`skoxozyajstvenny`x zhivotny`x pri invazionny`x

boleznyax // Rossijskij zhurnal «Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii». – 2018. – №1(25). – S. 10-17.

4. Babunova V.S., Popov P.A., Osipova I.S. Problema klassifikacii kormovy`x dobavok, ispol`zuemy`x v racione produktivny`x zhivotny`x // Rossijskij zhurnal «Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii». – 2020. – №1(33). – S. 12-16.

5. Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.V., Onishhenko D.A. Fal`sifikaciya produkcii zhivotnogo proizxozhdeniya // Rossijskij zhurnal «Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii». – 2017. – №3(23). – S. 17-23.

6. Mkrtumyan A.V., Butko M.P., Popov P.A. i dr. Matematicheskaya model` dinamiki gibeli mikroorganizmov pod dejstviem porazhayushhix faktorov // Rossijskij zhurnal «Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii». – 2017. – №2(22). – S. 59-62.

7. Babington R., Matas S., Marco M.P., Galve R. Current bioanalytical methods for detection of penicillins // Analytical and Bioanalytical Chemistry 2012; 403, 1549–1556.

8. Chafer-Pericas C., Maquieira A., Puchades R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples // Trends in Analytical Chemistry 2010; 29, 1038-1049.

9. Popov P.A., Babunova V.S., Osipova I.S. i dr. Metody` veterinarno-sanitarnoj e`kspertizy` produktov uboya zhivotny`x na ostatochny`e kolichestva lekarstvenny`x veshhestv v sostave kormovy`x dobavok // Rossijskij zhurnal «Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii». – 2019. – №3(31). – S. 272-280.

10. Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.V., Onishhenko D.A. Stimulyatory` rosta zhivotny`x i ix primenenie v zhivotnovodstve // Rossijskij zhurnal «Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii». – 2017. – №4(24). – S. 14-20.

11. Butko M.P., Gerasimov A.S. i dr. Veterinarno-sanitarny`e trebovaniya po obespecheniyu bezopasnosti proizvodstva myasa i myasoproduktov. – M.: Izdatel`skij dom «Nauchnaya biblioteka», 2017.