

Diagnosis of isoniazid poisoning in dogs

O.V. Bayer¹, O.V. Bondarets¹, Yu.V. Dobrozhan¹, N.V. Liniichyuk¹, O.M. Stupak¹, G.I. Dereviaga¹
L.V. Shevchenko², V.M. Mykhalska²

¹State Research Institute with laboratory diagnostics and veterinary-sanitary expertise

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

E-mail: kot30@meta.ua, dndildvse@vetlabresearch.g, shevchenko_laris@ukr.net, vitam@bigmir.net

Submitted: 15.01.2018. Accepted: 21.02.2018

The conducted researches have proved the possibility of using biological samples of pathological material from dogs containing stomachs for posthumous diagnosis of dogs with isoniazid poisoning. On the basis of the data obtained, the liquid chromatography method was modified and validated to identify and quantify the content of the isoniazid in the stomach that died from poisoning. The essence of the method for the determination of isoniazid consists in the selection of samples of the trapped stomach of the bodies of dogs, homogenization and deproteinization of samples followed by extraction of isoniazid with a solution of methanol. Identification and quantitative determination of isoniazid is carried out by liquid chromatography using a chromatograph with a dual mass spectrometric detector. It has been proved that a modified and adapted technique for determining the content of isoniazid in the stomach contents of dogs is sensitive and according to its parameters meets the European requirements. This method is fast enough, practical and reliable. The conducted researches have proved that out of 22 samples of biological material from homeless and domestic dogs that died from unspecified causes during 2016-2017, in the laboratory of the research chemical and toxicological department of the State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise Injury poisoning with isoniazid has been confirmed in 9 cases, which is 41% of the total deaths. The lowest concentration of isoniazid, which caused the death of dogs during 2016-2017, was detected in the stomach containing 90.5 µg / kg, and the highest - respectively - 5799.8 µg / kg. Given the high sensitivity, reproducibility and reliability of the method, it can be recommended for the diagnosis of poisoning homeless and domestic dogs with isoniazid in laboratories of veterinary medicine.

Key words: isoniazid, homeless and domestic dogs, corpses, liquid chromatography.

Спосіб визначення ізоніазиду в організмі собак при отруєнні

О.В. Байєр¹, О.В. Бондарець¹, Ю.В. Доброжан¹, Н.В. Лінійчук¹, О.М. Ступак¹, Г.І. Дерев'яга¹
Л.В. Шевченко², В.М. Михальська²

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

²Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

E-mail: kot30@meta.ua, dndildvse@vetlabresearch.g, shevchenko_laris@ukr.net, vitam@bigmir.net

Проведеними дослідженнями доведена можливість використання біологічних зразків патологічного матеріалу від собак, вмістимого шлунку для посмертної діагностики отруєння ізоніазидом собак. На основі одержаних даних модифіковано та валідовано метод рідинної хроматографії для ідентифікації та кількісної характеристики ізоніазиду у вмістимому шлунку, які загинули від отруєння. Суть методу визначення ізоніазиду полягає у відборі зразків вмістимого шлунку трупів собак, гомогенізації і депротейнізації зразків з наступною екстракцією ізоніазиду розчином метанолу. Ідентифікація та кількісне визначення ізоніазиду здійснюється методом рідинної хроматографії з використанням

хроматографа з подвійним мас-спектрометричним детектором. Доведено, що модифікована та адаптована методика з визначення вмісту ізоніазиду вмістимому шлунку собак є чутливою і за своїми параметрами відповідає європейським вимогам. Даний метод є досить швидким, практичним та достовірним. Проведеними дослідженнями доведено, що з 22 зразків біологічного матеріалу від бездомних і домашніх собак, що загинули з невстановлених причин протягом 2016 – 2017 років, в лабораторії науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи було підтверджено отруєння тварин ізоніазидом у 9 випадках, що становить 41 % від загальної кількості випадків загибелі. Найнижча концентрація ізоніазиду, що спричинила загибель собак протягом 2016 – 2017 років, і була виявлена у вмістимому шлунку, становила 90,5 мкг/кг, а найвища – відповідно – 5799,8 мкг/кг. Враховуючи високу чутливість, відтворюваність та достовірність методу, його можна рекомендувати для діагностики отруєння бездомних і домашніх собак ізоніазидом в лабораторіях ветеринарної медицини.

Ключові слова: ізоніазид, бездомні і домашні собаки, трупи, рідинна хроматографія.

Вступ

На сьогодні за оцінками експертів Україна входить в список світових лідерів за кількістю бездомних собак. Ця проблема стоїть особливо гостро як у великих населених пунктах (обласні центри), так і в невеликих містах і селах. За різними даними кількість бездомних собак може досягати 10 – 20 тисяч особин у великих містах. До основних причин зростання чисельності популяції бездомних собак у населених пунктах можна віднести наступні: безвідповідальне ставлення людей до тварин, що часто сприяє їх неконтрольованому розмноженню і потраплянню на вулиці небажаного потомства, а також відсутність стерилізації собак, які не використовуються для розведення і не мають породної цінності. Однією з не менш вагомих причин швидкого збільшення чисельності бездомних собак є наявність і доступність джерел корму: відкриті сміттєві баки і сміттєзвалища (часто стихійні), які містять відходи харчових продуктів, і слугують кормом для таких тварин, а також самі мешканці населених пунктів, які підгодовують і приманюють бездомних тварин до території поблизу своїх будинків (Christine Dell'Amore, 2014).

Вирішення проблеми регуляції чисельності бездомних собак в Україні здійснюється в основному комунальними підприємствами за рахунок створення притулків і їх обслуговування, однак вони забезпечують лише 20-30% від реальної потреби. Тому ця проблема залишається актуальною і мешканці населених пунктів часто вимушені вирішувати її самостійно, стикаючись з особливо агресивними тваринами, які населяють і захищають свою територію. Незважаючи на Закон України «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо запровадження гуманного ставлення до тварин» від 22.06.2017 № 2120-VIII, ст. 89 та ст. 299, які підвищують рівень відповідальності осіб за жорстоке поводження з тваринами, кількість випадків жорстокого поводження мешканців населених пунктів з безпритульними собаками залишається високою, оскільки цей закон не врегульовує цивілізоване вирішення цієї проблеми, а лише наслідки його невиконання (Zakon Ukrainy, 2017).

Досить часто проблему зменшення чисельності бездомних собак так звані «дог хантери» вирішують з допомогою фармацевтичних засобів, які використовують з метою отруєння тварин. До таких речовин належить широко розповсюджений препарат ізоніазид (тубазид) – який розроблений для лікування туберкульозу людей (American..., 1994; Schraufnagel, 1990; Kim et al., 2014; Delaine T. et al., 2010). Даний препарат випускається у формі таблеток без смаку і запаху, кожна таблетка містить 300 мг ізоніазиду (Committee..., 1994; Manufactured..., 2016; Bernadou et al., 2001).

Особливістю цього препарату є підвищена чутливість до нього у собак, у яких в організмі відсутній специфічний фермент N-ацетилтрансфераза, який розщеплює діючу речовину, що викликає отруєння тварин. Незважаючи на блювотний рефлекс, що виникає у собак при надходженні в організм цього препарату, значна частина його всмоктується в кров і викликає незворотні зміни в організмі. До того ж інколи умисне отруєння собак ізоніазидом поєднується з використанням протиблювотних засобів, що ще більше ускладнює перебіг і наслідки такого отруєння (Dorohov, 2002; Nguyen M. et al., 2002).

Крім того, досить часто реєструються випадки отруєння ізоніазидом не лише бродячих бездомних собак, але й домашніх, які випадково з'їдають отруєні приманки. Тому виникає необхідність вдосконалення, валідації та розробки надійних високочутливих і високоселективних методик ідентифікації цього препарату у середовищах організму та трупному матеріалі собак.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводили на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ).

Метою досліджень було модифікувати та валідувати метод рідинної хроматографії з визначення вмісту ізоніазиду в трупному матеріалі, відібраному від собак. Під час оцінки придатності методу використовували рідинний хроматограф з подвійним мас-спектрометричним детектором Waters XEVO TQ-S micro. Застосовували колонку аналітичну обернено-фазну Waters BEH C18 1,7 мкм, 100*2,1мм, рухома фаза була метанол та 0,1% водний розчин мурашиної кислоти.

Матеріалом для дослідження були зразки вмістимого шлунку собак, які загинули з невідомих причин.

Паралельно з досліджуваним зразком готували зразок з добавкою, проба контролю чистоти реактивів та референт-матеріалів.

Метод визначення ізоніазиду у біологічних зразках включає 5 основних етапів:

- відбір середньої проби вмістимого шлунку трупів собак;
- гомогенізація та депротейнізація екстракту;
- екстракція залишків ізоніазиду метанолом;
- ідентифікація та кількісне визначення ізоніазиду методом РХ-МС/МС.

Оцінювання придатності методу проводили відповідно до Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЄС від 12 серпня 2002 року, яке забезпечує виконання Директиви Ради 96/23/ЄС, що стосується ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів, а також відповідно до рекомендацій референс-лабораторій Євросоюзу в галузі контролю залишкових кількостей (CRLs) 20/1/2010 щодо оцінки придатності скринінгових методів за визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів.

Результати досліджень та їх обговорення

Як показав аналіз даних літератури, на сьогодні в Україні є необхідність розробки та використання сучасних методів ідентифікації окремих сполук, які є діючими речовинами препаратів як медичного, так і ветеринарного призначення (HPLC – MS Analysis, 2007; Melentev, Lavrenteva, 2011; Bajaj R. et al., 1991;). До останніх належить ізоніазид, який часто є причиною отруєння собак зі смертельними наслідками.

Для ідентифікації та кількісної характеристики ізоніазиду у тканинах загиблих собак використовують вмістиме шлунка трупів.

При використанні в якості матриці вмістимого шлунку трупів собак його за необхідності гомогенізували, депротейнізували, центрифугували 20 хв. за кімнатної температури із швидкістю 4500 об/хв. Після цього до 300 мм³ метанолу додавали 100 мм³ надосадової рідини з проби і перемішували на вортексі 15 секунд. Одержані таким чином екстракти аналізували з використанням рідинної хроматографії.

Виділення та кількісне визначення ізоніазиду у біологічній матриці методом РХ-МС/МС здійснювали за допомогою рідинного хроматомас-спектрометра «Waters» з подвійним мас-детектором.

Таблиця 1. Характеристики похибок вимірювань та валідаційні дані

№	Назва аналізу	Діапазон вимірювань масової частки ізоніазиду, мкг/мл	Допустима розбіжність між двома паралельними результатами, %	Границя сумарної відносної похибки при довірчій ймовірності P=0,95%
1	Ізоніазид	10 – 1000	20	30

При цьому діапазон вимірювань становив 10-10000 мкг/мл (табл. 1). Для даного аналізу застосовували колонку аналітичну обернено-фазну Waters C18 100x2.1mm ID, 3,5μ. В якості стандарту використовували ізоніазид VETRANAL® analytical standard. Тривалість хроматографування становила 5 хв., градієнт (рухома фаза) А: 100% метанол В: 0,1% розчин мурашиної кислоти. Елювання ізоніазиду проводили згідно схеми, наведеної в табл. 2.

Таблиця 2. Співвідношення градієнтів А та В

Час	А (100% метанол)	В (0,1% розчин мурашиної кислоти)
0	20	80
1	20	80
2	80	20
3	80	20
4	20	80
5	20	80

Проводячи дослідження на мас-спектрометрі задаються параметри наведені у табл. 3.

Час виходу ізоніазиду залежить від зміни градієнту, витрати елюенту, колонки.

Використовуючи рідинний хроматомас-спектрометр або колонки іншого типу, умови проведення аналізу, порядок виходу компонентів та відносний час утримання можуть бути іншими.

Умови виконання вимірювань підлягають перевірці та, за потреби, корегуванню в наступних випадках:

а) при використанні рідинного хроматомас-спектрометра іншої марки;

б) при заміні колонок;

в) після ремонту вузлів рідинного хроматомас-спектрометра, що впливають на чутливість детектора.

Таблиця 3. Параметри введення даних для проведення досліджень на рідинному хроматомас-спектрометрі

Компонент	Материнський іон	Дочірні іони	Напруження на конусі	Енергія зіткнення
Ізоніазид	138	79; 121	60	22

Рідинний хроматомас-спектрометр калібрують за градувальними розчинами. За результат аналізу приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, розбіжність між якими не перевищує значення допустимої розбіжності, що встановлюється нормами точності вимірювань. Якщо ця умова не виконується, то вимірювання повторюють для виключення грубих помилок. Після калібрування рідинного хроматографа проводять аналіз екстрактів дослідних зразків, розрахунок концентрації проводили з урахуванням площі піків на хроматограмах. Як показали результати досліджень за 2016 рік, в лабораторію науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи надійшло 13 зразків вмістимого шлунку трупів собак, які загинули з невстановлених причин, з них 6 зразків виявилось позитивними щодо отруєння їх ізоніазидом (рис. 1).

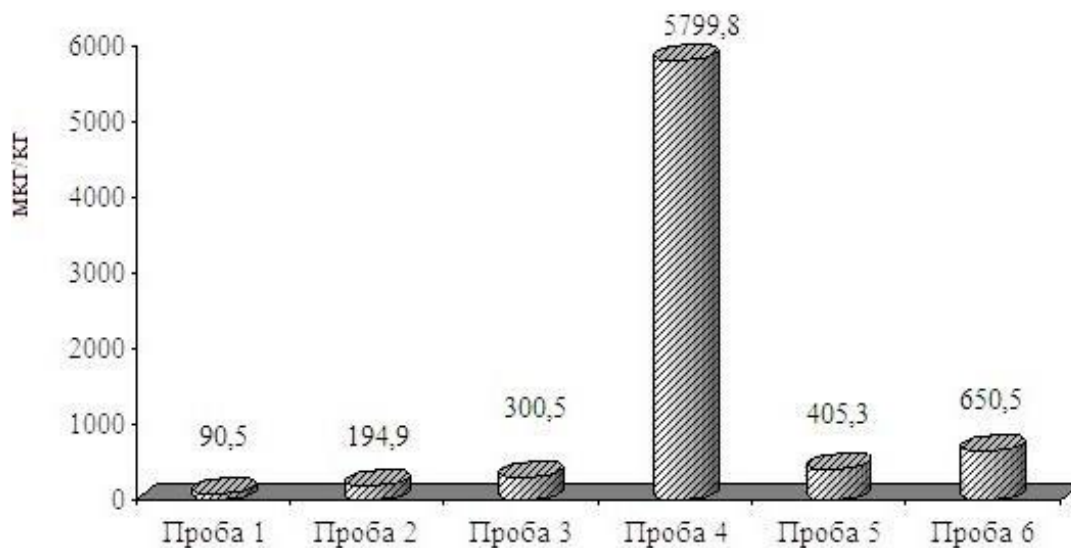


Рисунок 1. Рівень ізоніазиду у вмістимому шлунку трупів собак, що загинули в 2016 році

Як видно з рис. 1, концентрація ізоніазиду у вмістимому шлунку загиблих собак (проби 1 і 2) досить незначна, незважаючи на те, що ймовірно причиною їх загибелі був вказаний препарат. У вмістимому шлунку собак (проби № 3, 5 та 6) вміст ізоніазиду вищий в декілька разів порівняно з результатами проби № 1 і 2, що вказує про різну дозу цього засобу, яка потрапила в шлунково-кишковий тракт тварин, а також, можливо, це пояснюється дещо меншим терміном перебування ізоніазиду в організмі собаки, що сприяло меншому всмоктуванню даної діючої речовини в кров із шлунку, або ж проходження його в наступні відділи системи травлення – кишечник, чи в процесі блювоти – назовні.

Особливо високою виявилася концентрація ізоніазиду у вмістимому шлунку собаки (проба № 4), яка більше ніж в 10 разів перевищувала аналогічний показник у досліджуваних пробах № 3, 5 та 6, що з високою вірогідністю вказує на значну кількість цього препарату у кормі, який з'їла загибла тварина, а також про незначний термін, що пройшов після надходження його в організм.

Як показали результати досліджень вмістимого шлунку загиблих бездомних і домашніх собак за 2017 рік з 9 проб 3 виявилися позитивними (рис. 2).

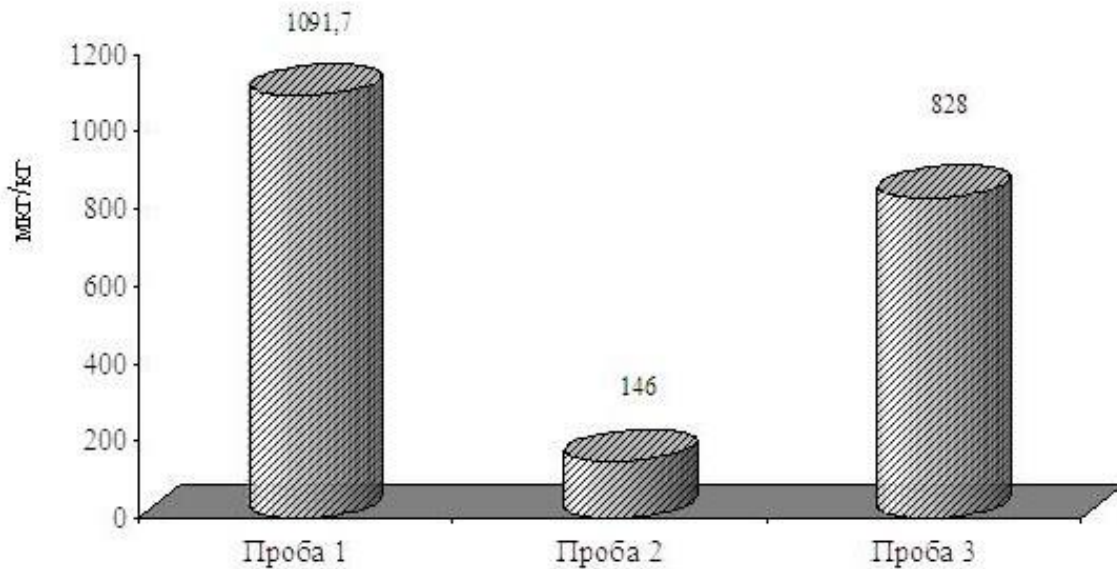


Рисунок 2. Рівень ізоніазиду у вмістимому шлунку трупів собак, що загинули в 2017 році

Як видно з одержаних даних (рис. 2), рівень ізоніазиду у вмістимому шлунку собак в пробах 1 та 3 був високим, а в пробі № 2 він був значно нижчим, однак його кількість також виявилася смертельною для тварини.

В основі механізму токсичної дії ізоніазиду на організм собак лежить блокування ізоніазидом піридоксину, що в свою чергу приводить до порушення синтезу гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК), яка приймає участь в утилізації (засвоєнні) глюкози нервовими клітинами, впливає на кровопостачання, дихання клітин і енергетичний обмін організму в цілому. ГАМК – найважливіший гальмівний нейромедіатор центральної нервової системи, що попереджує перезбудження і нормалізує тонус м'язів.

Аналізуючи дані щодо отруєння ізоніазидом собак, одержані протягом 2016 – 2017 років, можна прийти до висновку, що найменша смертельна концентрація цієї речовини, яка була виявлена у вмістимому шлунку, становила 90,5 мкг/кг, а найвища – 5799,8 мкг/кг.

Як відомо смертельно небезпечна доза ізоніазиду для собак становить – 50 мг/кг маси тіла. Отже, якщо маса собаки складає 10 кг, то кількість таблеток, що можуть бути смертельними для неї складає 2 штуки, а при масі 20 кг – 3 таблетки ізоніазиду. Однак, навіть якщо собаки дрібних порід, або цуценята крупних порід випадково з'їдять навіть 1 таблетку, то відбудеться отруєння різного ступеня тяжкості. Крім того, ізоніазид як речовина проникає через плацентарний бар'єр і виділяється з молоком у лактуючих сук, що може спричинити не лише загибель матері, але й цуценят як в пренатальний, так і постнатальний періоди життя.

Висновки

Таким чином, одержані результати досліджень дозволяють рекомендувати для ідентифікації і кількісного визначення ізоніазиду у вмістимому шлунку собак як метод діагностики отруєння тварин метод рідинної хроматографії з використанням хроматографа з подвійним мас-спектрометричним детектором. Даний метод є чутливим і за своїми параметрами відповідає європейським вимогам.

Встановлено, що смертельна концентрація ізоніазиду у вмістимому шлунку собак становить від 90,5 мкг/кг до 5799,8 мкг/кг маси тіла.

References

- American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Committee on the Control of Infectious Diseases. (1994). Red book: report of the Committee on Infectious Diseases. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics.
- Bass, J.B. Jr., Farer, L.S., Hopewell, P.C., O'Brien, R., Jacobs, R.F., Ruben, F., Snider, D.E. Jr., Thornton, G. (1994). American Thoracic Society/Centers for Disease Control: Treatment of Tuberculosis and Tuberculosis Infection in Adults and Children. *Amer. J. Respir Crit Care Med*, 149(5), 1359–1374.
- Bajaj R., Nangia H., Jain C.L. (1991). Colorimetric determination of isoniazid in formulation by complexation with nickel (II) and copper (II) picrates. *J. Indian chem.* 1991. 68, 9. 534-535.
- Bernadou J1, Nguyen M, Meunier B. (2001). The mechanism of action of isoniazid. A chemical model of activation. *Ann Pharm Fr.* 2001 Sep;59(5):331-7.
- Delaine T, Bernardes-Génisson V, Quémard A, Constant P, Meunier B, Bernadou J. (2010). Development of isoniazid-NAD truncated adducts embedding a lipophilic fragment as potential bi-substrate InhA inhibitors and antimycobacterial agents. *Eur J Med Chem.* 2010 Oct;45(10):4554-61. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.07.016. Epub 2010 Jul 15.
- Christine Dell'Amore (2014). Stray Dogs in Sochi: What Happens to the World's Free-Roaming Canines? National Geographic. Published february 8, 2014 <https://news.nationalgeographic.com/news/2014/02/140206-stray-dogs-russia-sochi-olympics-killing-animals-world/>
- Dorohov, S.M. (2002). *Farmakolohyia*. Kharkov: Yzdatelskyit sentr KhAY (in Russian).
- Kim, M.U., Murzagulova, M.U., Stepanova, E.F. (2014). Issledovanie biodostupnosti lekarstvennogo preparata Isoniazid-D tabletki dispergiruemye. *Fundamentalnyie issledovaniya*, 3, 766–769 (in Russian).
- Manufactured for: Sandoz Inc., Princeton, NJ 08540. Manufactured by: Epic Pharma, LLC, Laurelton, NY 11413. Revised: Apr 2016.
- Melentev, A.B., Lavrenteva, A.V. (2011). Opredelenie izoniazida v trupnoy krvi i plazme metodom vyisokoeffektivnoy zhidkostnoy hromatografii s diodno-matrichnym detektorom. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*, 4, 27–30 (in Russian).
- Nguyen M, Quémard A, Broussy S, Bernadou J, Meunier B. (2002). Mn(III) pyrophosphate as an efficient tool for studying the mode of action of isoniazid on the InhA protein of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jul;46(7): 2137-44.
- Schraufnagel, D.E. (1990). Testing for Isoniazid; *Chest (United States)*, 98(2), 314–316.
- Wang, A., Zhang, W., Sun, J., Liu, J., Sang, Y., Gao, S., He, Z. (2007). HPLC – MS Analysis of Isoniazid in dog plasma. *Chromatographia*, 66(9), 741–745.
- Zakon Ukrainy Pro vnesennia zmin do deiakykh zakonodavchykh aktiv Ukrainy shchodo zaprovadzhennia humannoho stavlennia do tvaryn vid 22.06.2017 № 2120-VIII chynnyi z 04.08.2017 Available from: http://search.ligazakon.ua/l_doc2.nsf/link1/T172120.html/ Accessed on 12.01.2018 (in Ukrainian).

Citation:

Bayer, O.V. Bondarets, O.V., Dobrozhan, Yu.V., Liniichuk, N.V., Stupak, O.M., Dereviaga, G.I., Shevchenko, L.V., Mykhalska, V.M. (2018) Diagnosis of isoniazid poisoning in dogs. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 498–502.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License
