

**РОЗРОБКА ЗАСОБУ КОНТРОЛЮВАННЯ ЗАЛИШКОВИХ
КІЛЬКОСТЕЙ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ В ПРОДУКЦІЇ
ТВАРИННИЦТВА БІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ**

ГОЛОВКО А.М., доктор ветеринарних наук

ПНЧУК Н.Г., кандидат ветеринарних наук

ДМИТРИЄВА Г.В., аспірант

КИСЕЛЬОВА Т.Ф., старший науковий співробітник

Наведено результати розробки біологічних засобів контролювання залишкових кількостей протимікробних препаратів у продуктах тваринного походження. Розширено перелік визначення протимікробних препаратів різних груп біологічним методом з урахуванням вимог вітчизняної та міжнародної нормативно-законодавчої бази та впроваджено в практику ветеринарної медицини набір тест-штамів мікроорганізмів для визначення залишкової кількості ПМП в сировині та продуктах тваринного походження з урахуванням чутливості тест-мікробів до широкого спектра антибіотиків.

Ключові слова: *антибіотики, чутливість, тест-штами.*

Однією з актуальних проблем ХХІ століття є забезпечення населення планети якісними та безпечними харчовими продуктами. На вирішення цієї проблеми спрямовані зусилля і засоби багатьох високорозвинених країн. Обговорюються і розробляються різні підходи виходу з продовольчої кризи в світі, одним з яких є використання біологічно активних речовин у сільськогосподарському виробництві, зокрема, тваринництві.

Нині світовий обсяг виробництва антибіотиків для тваринництва оцінюється в 4 млрд. дол. у рік [1].

За даними Всесвітньої організації охорони (WHO) здоров'я більше половини всіх антибіотиків, які виробляються в світі, використовуються в тваринництві не для лікування, а для стимуляції росту[4].

За даними джерел іноземної літератури, до 12% зразків м'яса і м'ясних продуктів у Німеччині забруднені залишками антибіотиків, у США – до 27% та у Франції – до 7,4%. Ще більше забруднено м'ясо птиці [1,2].

Так, основними проблемами при використанні антибіотиків є: збільшення доз препаратів, недотримання технологічних регламентів використання та строків витримки до забою.

За даними літератури, при проведенні досліджень 146 зразків м'яса від диких і свійських тварин встановлено, що в м'ясі диких тварин відсутні залишки ПМП, а у свійських – в 46% проб м'яса, 32% містили пеніцилін [1,3].

Вивчення цього питання відкриває шлях до пошуку можливостей розширення переліку ПМП, що будуть контролюватися мікробіологічним методом. Ці актуальні положення і визначили вибір напрямів наших досліджень та методи виконання роботи.

Метою дослідження є моніторинг залишків протимікробних препаратів у продуктах тваринного походження, та за його результатами, визначити основні групи антибіотиків, рекомендованих для контролювання їх залишкових кількостей вітчизняної та міжнародної законодавчою базою та розробити набір тест-штамів мікроорганізмів для визначення залишкової кількості ПМП у сировині та продуктах тваринного походження.

Матеріали і методи досліджень. У дослідженнях використовували такі тест-штами: *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537, *Bacillus subtilis* var. L2, *Bacillus cereus* var. *mycoides* НВ, *Staphylococcus aureus* 209 P, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus subtilis* 6633, *Streptococcus thermophilus*, *Micrococcus luteus* 9341, *Micrococcus luteus* 10240, *Bacillus pumilus* 8241, *Streptococcus faecium* та *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953, які депоновані за результатами наших досліджень в ДНКІБШМ, комерційні протимікробні препарати для визначення чутливості тест-штамів, а також стандартні зразки: пеніцилін G, ампіцилін, «Наукові доповіді НУБіП» 2013-3 (39) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2013_3/13gam.pdf

амоксицилін, цефтріаксон, цефазолін, еритроміцин, стрептоміцин, тетрациклін, окситетрациклін, гентаміцин, неоміцин, канаміцин, фуразолідон, нітрофурантоїн, хлорамфенікол, бацитрацин, енрофлоксацин, сульфадиметоксин, триметоприм (виробник Sigma, Німеччина та РФ ВГНКИ). Вибір стандартних зразків базувався на аналізі допустимих мінімальних концентрацій антибіотиків, за результатами моніторингу.

Харчові продукти тваринного походження (м'ясо, молоко, сир, сметану, яйця) відбирали на ринках та штучно контамінували деякі продукти в концентраціях нижчих та вищих допустимих норм, регламентованих вітчизняною та міжнародною законодавчою базою[4]. При цьому використовували бактеріологічні, серологічні, статистичні методи досліджень.

Для розширення спектра ПМП використовували мікробіологічні методи дифузії в агар та диско-дифузійним методом.

Визначення активності та чутливості мікроорганізмів провели згідно з методикою викладеною в Державній Фармакопеї України.

Результати досліджень. При аналізі вітчизняних і європейських та міжнародних документів, з'ясовано, що в продуктах тваринництва присутні представники основних груп протимікробних препаратів. На основі офіційної звітності державної ветеринарної та фіто-санітарної служби України встановлено, що наша нормативна база визначає лише чотири антибіотики, а в країнах ЄС - 74 препарати.

Одиниці виміру залишкової кількості антибіотиків в Україні відрізняються від системи вимірювання в ЄС. В Україні визначають залишкову кількість лише бацитрацину (0,02 ОД/г), стрептоміцину (0,5 ОД/г), левоміцетину (0,01 мг/кг), тетрацикліну (0,01 ОД/г) та бензилпеніциліну (ОД/г) де чітко в нормативній документації вказуються допустимі концентрації цих антибіотиків у продуктах харчування. А триметоприм, амоксицилін, фуразолідон, цефазолін, сульфадиметоксин, неоміцин, енрофлоксацин та інші, які зустрічаються в вітчизняній та імпорتنій продукції, не контролюються, бо не має критеріїв, допустимих норм у продуктах харчування.

У міжнародній документації суворо забороняється присутність таких ПМП як хлорамфенікол (в Україні – 0,01мг/кг).

За результатами моніторингу відібрали основні групи антибіотиків для визначення їх залишкової кількості в сировинні та продукції тваринного походження для розширення спектра визначення ПМП біологічним методом.

Критерієм чутливості мікроорганізмів до антибіотика слугувала розрахована на 1 мл поживного середовища мінімальна концентрація, яка інгібує ріст збудника при стандартних умовах постановки досліду.

Тест чутливості наших досліджуваних мікроорганізмів до антибіотиків (концентрація 0,1 мкг/мл) дав можливість визначити найчутливіші штами. Результати наведені в таб. № 1

1.Чутливість тест-штамів до протимікробних препаратів

Антибіотик	Концентрація антибіотика в поживному середовищі, ОД/мл, мкг/мл									
	Діаметр зони затримки росту, мм (± 1 мм)									
	L2	537	НВ	6633	9341	10240	11778	209 Р	Calid.	Ther.
Пеніцилін	15,0	-	19,5	-	18,0	10,1	-	18,1	28,0	24,1
Ампіцилін	12,3	-	20,3	-	20,2	9,7	-	16,0	30,0	25,0
Амоксицилін	-	-	-	-	-	25,2	-	-	14,0	16,7
Стрептоміцин	15,0	12,0	-	-	-	-	-	14,2	-	12,1
Еритроміцин	-	-	14,0	16,3	15,0	-	-	17,8	-	-
Бацитрацин	13,5	-	-	-	16,0	13,3	-	-	14,8	17,1
Канаміцин	18,0	17,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Гентаміцин	18,5	-	-	-	12,0	-	-	-	-	-
Неоміцин	20,0	12,3	-	-	-	-	-	11,0	-	-
Хлорамфенікол	12,5	-	-	-	19,0	20,0	-	18,1	23,0	10,0
Тетрациклін	14,6	19,5	-	-	12,6	13,2	28,0	12,4	-	-
Триметоприм	25,0	-	-	-	13,33	16,7	-	-	-	-
Нітрофурантоїн	-	-	-	-	-	8,0	-	-	-	16,0
Фуразолідон	-	-	-	-	-	-	-	-	16,5	-
Сульфадиметок.	14,0	-	-	-	13,7	15,3	-	-	19,1	-

Цефазолін	-	-	15,0	-	16,0	20,1	-	-	14,5	16,5
Цефтріаксон	-	-	10,5	-	13,5	18,2	-	-	21,0	16,3

«-» - відсутня зона затримки росту культури при концентрації 0,1 мкг/мл антибіотика

За даними таблиці *Bacillus subtilis* var. L2чутливий до стрептоміцину (діаметр зони 15 мм) та високочутливий до триметоприму (25 мм), неоміцину (20 мм); *Micrococcus luteus* 10240 малочутливий до ампіциліну (9,7 мм) та нітрофурантоїну (8 мм) та високочутливий до амоксициліну (25,2 мм), хлорамфеніколу (20 мм), цефазоліну (20,1 мм); *Bacillus cereus* 11778 високочутливий до тетрацикліну (28 мм); *Bacillus stearothermophilus calidolactis* C-953 проявив високу чутливість до пеніциліну (28 мм), ампіциліну (30 мм), хлорамфеніколу (23 мм), цефтріаксону (21 мм), фуразолідону (16,5 мм); *Streptococcus thermophilus* високочутливий до пеніциліну (24 мм), ампіциліну (25 мм), бацитрацину (17 мм); *Bacillus subtilis* 6633 досить чутливий до еритроміцину (16,3 мм); *Micrococcus luteus* 9341 високочутливий до пеніциліну (18 мм), ампіциліну (20 мм), хлорамфеніколу (19 мм); *Bacillus cereus* var. *mycoides* НВ виявився чутливим до цефазоліну (15 мм) і високочутливим до пеніциліну (19,5 мм), ампіциліну (20,3 мм); *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537 високочутливий до тетрацикліну (19,5), канаміцину (17,5); *Staphylococcus aureus* 209 Р високочутливий до еритроміцину (17,8 мм), пеніциліну (18,1 мм), хлорамфеніколу (18,1 мм).

Наступним етапом нашого дослідження було тестування відібраних мікроорганізмів за ступенем чутливості до антибіотиків, що вивчали.

Ступінь чутливості мікроорганізмів визначали методом дифузії в агар. Як поживне середовище використали агар Мюллера-Хінтона.

Кількість пробірок з розведеним антибіотиком готували із таким розрахунком, щоб в нашому спектрі були присутні концентрації антибіотика від 0,001 до 100 мкг/мл.

В результаті досліджень було визначено межі чутливості десяти штамів мікроорганізмів до сімнадцяти антибіотиків, які найчастіше використовуються

у ветеринарії. Нижні межі чутливості досліджуваних культур наведено в таб. № 2.

2. Нижня межа чутливості тест-культур до антибіотиків

Антибіотик	Концентрація антибіотика в поживному середовищі, ОД/мл, мкг/мл									
	L2	537	НВ	6633	9341	10240	11778	209 P	Calid.	Ther.
Пеніцилін	0,05	-	0,01	-	0,01	0,01	-	0,01	0,001	0,001
Ампіцилін	0,05	10	0,01	-	0,1	0,01	-	0,01	0,001	0,01
Амоксицилін	1	1	1	10	10	0,001	-	-	0,1	0,1
Стрептоміцин	0,05	0,5	-	5	1	0,5	-	0,1	0,04	0,1
Еритроміцин	10	-	0,02	0,02	0,01	-	-	0,02	0,01	1
Бацитрацин	0,5	1	10	-	0,01	0,02	10	5	0,1	0,1
Канаміцин	0,01	0,001	1	-	1	1	5	1	1	5
Гентаміцин	0,001	1	-	-	0,5	5	-	5	0,005	1
Неоміцин	0,001	0,1	-	-	1	1	10	0,5	0,007	100
Хлорамфенікол	0,1	1	100	100	0,001	0,001	-	0,01	0,001	0,1
Тетрациклін	0,01	0,01	-	-	0,1	0,5	0,001	0,1	0,01	0,5
Триметоприм	0,01		-	-	0,5	0,1	10	10	1	10
Нітрофурантоїн	100	10	100	-	5	0,5	-	-	1	0,01
Фуразолідон	1	-	-	-	100	100	-	-	0,01	10
Сульфадиметок.	0,1	10	-	100	0,1	0,1	-	10	0,008	-
Цефазолін	10	-	0,003	-	0,01	0,003	-	-	0,01	0,01
Цефтріаксон	-	-	0,5	-	0,1	0,01	-	-	0,003	0,003

Мікроорганізми по-різному виявили чутливість до досліджених антибіотиків. До пеніцилінової групи високочутливими були: *Bacillus stearothermophilus calidolactis* C-953, *Streptococcus thermophilus*. Штами із широким спектром чутливості майже до всіх груп протимікробних препаратів, окрім триметоприму і високочутливими до цефтріаксону (0,003 мкг/мл), сульфадиметоксину (0,008 мкг/мл), цефазоліну (0,01 мкг/мл) та тетрацикліну (0,01 мкг/мл та 0,5 мкг/мл).

Широкий спектр чутливості до тетрациклінів має *Bacillus cereus* 11778 (його нижня межа сягає 0,001 мкг/мл) тоді як у всіх інших штамів він нижчий.

Штам *Bacillus subtilis* var. L2 єдиний з всіх досліджуваних виявився чутливим як до максимальних, так і до мінімальних концентрацій гентаміцину, неоміцину, триметоприму, стрептоміцину, а також досить чутливий до фуразолідону (1 мкг/мл).

Штам *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537 володіє широким спектром чутливості (чутливий до стрептоміцину, тетрацикліну) та досить виявився чутливим до канаміцину (0,001 мкг/мл).

Bacillus cereus var. *mycoides* НВ високочутливий до цефазоліну (0,003 мкг/мл) разом із *Micrococcus luteus* 10240, чутливий до еритроміцину та пеніцилінової групи.

Bacillus subtilis 6633 досить чутливий до еритроміцину і єдиний дав чіткі зони до мінімальної концентрації еритроміцину.

Штам *Micrococcus luteus* 9341 з широким спектром чутливості до різних груп антибіотиків, але найбільш себе проявив відносно хлорамфеніколу (0,001 мкг/мл), еритроміцину, бацитрацину та пеніцилінової групи.

Micrococcus luteus 10240 також має широкий спектр чутливості, але найчутливішим був до бацитрацину, хлорамфеніколу, амоксициліну та цефтріаксону.

Штам *Staphylococcus aureus* 209 Р досить чутливий до пеніцилінової групи, хлорамфеніколу та еритроміцину (0,02 мкг/мл).

На основі даних, отриманих при визначенні чутливості різних штамів мікроорганізмів до мінімальних концентрацій основних протимікробних препаратів, запропоновано засоби стандартизації контролювання залишкових кількостей ПМП, з подальшою можливістю їх диференціації в продуктах тваринного походження:

- 1) *Bacillus subtilis* var. L2 рекомендований для визначення нітрофуранів (фуразолідон, нітрофурантоїн), пеніцилінів (бензилпеніцилін, ампіцилін), тетрациклінів, аміноглікозидів (гентаміцин, неоміцин, канаміцин), карбапенемів (триметоприму).

- 2) *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537 - аміноглікозидів (стрептоміцин), пеніциліні (бензилпеніцилін, ампіцилін), аміноглікозидів (канаміцин).
- 3) *B. cereus* НВрекомендований для визначення макролідів (еритроміцин), пеніцилінів, цефалоспоринів (цефазолін).
- 4) *Bacillus subtilis* 6633 - макролідів (еритроміцин).
- 5) *Micrococcus luteus* 9341- пеніцилінів, хлорамфеніколу, макролідів, сульфаніламідів (сульфадиметоксин).
- 6) *Micrococcus luteus* 10240 - пеніцилінів, тетрациклінів, хлорамфеніколу, бацитрацину, цефалоспоринів (цефазолін).
- 7) *Bacillus cereus* 11778 - антибіотиків тетрациклінового ряду.
- 8) *Staphylococcus aureus* 209 P - макролідів (еритроміцин), пеніцилінів, хлорамфеніколу.
- 9) *Bacillus calidolactis* C-953 - нітрофуранів (фуразолідон, нітрофурантоїн), цефалоспоринів (цефтріаксон), пеніцилінів, хлорамфеніколу, сульфаніламідів (сульфадиметоксину).
- 10) *Streptococcus thermophilus* - нітрофуранів, пеніцилінів, аміноглікозидів (стрептоміцин), бацитрацину.

Висновки:

1. Проведено моніторинг залишків ПМП в сировині та продукції тваринного походження;
2. За результатами моніторингу визначено ПМП, залишки яких зустрічаються в сировині та продукції тваринного походження для розширення спектра виявлення ПМП біологічним методом;
3. Вивчено чутливість мікроорганізмів до основних груп антибіотиків, які використовуються в ветеринарії, для підбору уніфікованих чутливих тестових систем до широкого спектру антибіотиків.
4. З'ясовано межі чутливості десяти штамів мікроорганізмів до основних груп антибіотиків, які найчастіше використовуються у ветеринарії.
5. Підбрано еталонні культури тест-штамів індивідуально до окремих антибіотиків різних груп протимікробних препаратів.

6. Розроблено засоби контролю залишкових кількостей ПМП в продукції тваринництва біологічним методом.

Список літератури

1. Гуфрій Д. Використання антибіотиків у тваринництві – порятунок чи поява нової проблеми при прогресуючому зростанні опірності мікроорганізмів проти них / Д. Гуфрій // Ветеринарна медицина України. – 2000. – № 8. – С. 20-22.
2. Кальницкая О.И. Уровень обнаружения антибиотиков в продуктах убоя, полученных из отечественного и импортного сырья / Туник А.Н., Уша Б.В., Кальницкая О.И. // Ветеринария. – 2007. - № 4. – С. 48-53.
3. Кальницкая О.И. Антибиотики в мясных продуктах питания / Кальницкая О.И., Мулюкова А.П. // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Материалы научно-практической конференции. - Санкт-Петербург: - 2005. - С. 88-89.
4. Tollefson L. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance / L.Tollefson, S.F.Altekruse, M.E. Potter // Rev. Sci. Tech. – 1997.– Vol. 16. – P. 709-715.

Разработка средств контролирования остаточных количеств противомикробных препаратов в продукции животноводства биологическим методом

А. Н. Головки, Н. Г. Пинчук, А. В. Дмитриева, Т. Ф. Киселева

Приведенны результаты разработки биологических средств контролирования остаточных количеств противомикробных препаратов в продуктах животного происхождения. Расширен перечень определения противомикробных препаратов разных групп биологическим методом с учетом отечественной и международной нормативно законодательной базы и внедрен в практику ветеринарной медицины набор тестовых штаммов микроорганизмов «Наукові доповіді НУБіП» 2013-3 (39) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2013_3/13gam.pdf

для определения остаточного количества ПМП в сырье и продуктах животного происхождения с учетом чувствительности тестовых микробов к широкому спектру антибиотиков.

Ключевые слова: *антибиотики, чувствительность, тест-штаммы.*

Development of mean of controlling of remaining amounts of protimikrobnikh preparations in the products of stock-raising by a biological method

A. N. Golovko, N. G. Pinchuk, G. V. Dmytryeva, T. F. Kiselova

In the article the resulted results of development of biological facilities of controlling of remaining amounts of antimicrobial preparations in the products of animal origin. The list of determination of antimicrobial preparations of different groups is extended by a biological method taking into account international normatively legislative bases and the set of cultures of tests is inculcated in practice of veterinary medicine for determining the remaining amount of AMP in raw material and products of animal origin taking into account the sensitiveness of microbes of tests to wide spectrum of antibiotics.

Keywords: antibiotics, sensitivity, test strains.