

УДК 636.09:615.33.001.42:351.773

А.М. ГОЛОВКО, докт. вет. наук
 Н.Г. ПІНЧУК, канд. вет. наук
 Г.В. ДМИТРИЄВА, аспірант
 Т.Ф. КИСЕЛЬОВА, ст. наук. співробітник
 Державний науково-дослідний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ

РОЗРОБЛЕННЯ ЗАСОБУ КОНТРОЛЮ БІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ПРОТИМІКРОБНИХ Х ПРЕПАРАТІВ У ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА

Наведено результати розроблення біологічних засобів контролю залишкових кількостей протимікробних препаратів у продуктах тваринного походження відповідно до вимог вітчизняної та міжнародної нормативно-законодавчої бази. У практику ветеринарної медицини впроваджено набір тест-штамів мікроорганізмів для визначення залишкової кількості ПМП у сировині й продуктах тваринного походження з урахуванням чутливості тест-мікробів до широкого спектра антибіотиків.

Забезпечення населення планети якісними й безпечними харчовими продуктами є однією з актуальних проблем ХХІ ст., на вирішення якої спрямовані зусилля й кошти багатьох високорозвинених країн. Нині обговорюються й розробляються різні способи виходу з продовольчої кризи у світі, один з яких – використання біологічно активних речовин у сільськогосподарському виробництві, зокрема тваринництві.

Світовий обсяг виробництва антибіотиків для тваринництва оцінюють сьогодні в 4 млрд дол. на рік.

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

Згідно з зарубіжними джерелами в Німеччині до 12% зразків м'яса і м'ясних продуктів забруднені залишками антибіотиків, у США – до 27%, Франції – до 7,4%, особливо це стосується м'яса птиці.

Так, основними проблемами при використанні антибіотиків є збільшення доз препаратів, недотримання технологічних регламентів використання та строків передзабійної витримки тварин.

За даними літератури при дослідженні 146 зразків м'яса було встановлено, що в м'ясі диких тварин відсутні залишки ПМП, а в м'ясі домашніх їх було виявлено в 46% проб. Із них у 32% проб містився пеніцилін [6].

У Голландії під час дослідження тканин і органів у 12% ВРХ, 58% телят, 23% свиней було виявлено залишкові кількості антибіотиків [3].

У Німеччині досліджували залишкову кількість антибіотиків в органах і

тканинах шляхом узяття 2000 проб, відібраних від здорових і примусово забитих тварин. Позитивними виявилися 273 проби (13,65%), у т. ч. від свиней – 90 (32,96%), корів – 84 (30,78%), телят – 38 (19,81%), овець – 2 (0,73%), кіз – 1 (0,36%), бичків – 58 (21,24%) [4].

Отже, можна стверджувати, що антибіотики широко застосовуються для лікування людей і тварин, а також як добавки до раціону сільськогосподарських тварин і птиці з метою стимуляції росту й профілактики деяких інфекцій. Однак їх використання спричиняє підвищення стійкості до них патогенних мікроорганізмів і появу антибіотикорезистентності [5]. Це значно утруднює лікування інфекційних хвороб людей і тварин.

Вивчення цього питання дає можливість розширити перелік ПМП, які будуть контролюватися мікробіологічним методом. Такі актуальні положення й визначили вибір напрямів наших досліджень і методи виконання роботи.

Мета роботи – моніторинг залишків протимікробних препаратів у продуктах тваринного походження та розроблення набору тест-штамів мікроорганізмів для визначення залишкової кількості ПМП у сировині й продуктах тваринного походження.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У дослідженнях використовували тест-штами *Bacillus cereus var. mycoides* 537, *Bacillus subtilis var. L2*, *Bacillus cereus var. mycoides HB*, *Staphylococcus aureus* 209 P, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus subtilis* 6633, *Streptococcus thermophilus*, *Micrococcus luteus* 9341, *Micrococcus luteus* 10240, *Bacillus pumilus* 8241,





Таблиця 1 – Порівняльна таблиця допустимих мінімальних концентрацій антибіотиків у продуктах країн Європи та України

Антибіотик	Назва продукту	Вид тварин	Допустима концентрація, мкг/кг	Україна		
				Назва продукту	Вид тварин	Допустима концентрація
	Європа			Україна		
Триметоприм	М'ясо, жир, печінка, молоко	Всі	50			
Амоксицилін	М'ясо, жир, печінка Молоко	Всі	50 4			
Ампіцилін	М'ясо, жир, печінка Молоко	Всі	50 4			
Бензилпеніцилін	М'ясо, жир, печінка Молоко	Всі	50 4	Молоко, масло	ВРХ, ДРХ	0,01 ОД/г
Енрофлоксацин	М'ясо, молоко	ВРХ, ДРХ, свині, птиця	100			
Еритроміцин	М'ясо, жир, печінка Молоко Яйця	Всі	200 40 150	Мед	–	Не допуск.
Тетрацикліновий ряд	М'ясо, жир Печінка Молоко Яйця	Всі	100 300 100 200	Мед М'ясо, жир, молоко, яйця	Всі	Не допуск. 0,01 ОД/г
Гентаміцин	М'ясо, жир Печінка Молоко	ВРХ, свині	50 200 100			
Канаміцин	М'ясо, жир Печінка Молоко	Всі	100 600 150			
Неоміцин	М'ясо, жир, печінка Молоко Яйця	Всі	500 1500 500	Мед	–	Не допуск.
Стрептоміцин	М'ясо, жир, печінка Молоко	ВРХ, ДРХ, свині	500 200	Мед Яйця, молоко, масло	Всі	Не допуск. 0,5 ОД/г
Бацитрацин	Молоко	ВРХ	100	М'ясо, птиця, жир, яйця	Всі	0,02 ОД/г
Цефазолін	Молоко	ВРХ	50			
Цефалексин	М'ясо, жир, печінка Молоко	ВРХ	200 100			
Сульфаніламід	М'ясо, жир, печінка, молоко	Всі	100			
Хлорамфенікол	Всі	Всі	Не допуск.	М'ясо, птиця, жир, яйця, молоко	Всі	0,01 мг/кг
Нітрофуранові	М'ясо, жир, печінка	Всі	5			

Streptococcus faecium та *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* C-953, які були задепоновані в результаті наших досліджень у ДНКІБШМ, комерційні протимікробні препарати для визначення чутливості тест-штамів, а також стандартні зразки: пеніцилін G, ампіцилін, амоксицилін, цефтріаксон, цефазолін, еритроміцин, стрептоміцин, тетрациклін, окситетрациклін, гентаміцин, неоміцин, канаміцин, фуразолідон, нітрофурантоїн, хлорамфенікол, бацитрацин, енрофлоксацин, сульфадиметоксин, триметоприм (виробник Sigma, Німеччина та ВГНКИ, РФ). Вибір стандартних зразків базувався на аналізі допустимих мінімальних концентрацій антибіотиків за результатами моніторингу.

Харчові продукти тваринного походження (м'ясо, молоко, сир, сметана, яйця) відбирали на ринках і штучно контамінували деякі з них у концентра-

ціях, нижчих та вищих від допустимих норм, регламентованих вітчизняною і міжнародною законодавчою базою [2].

Нами було використано бактеріологічні, серологічні й статистичні методи досліджень. З метою розширення спектра чутливості ПМП визначали методами дифузії в агар та диско-дифузійним.

Активність і чутливість мікроорганізмів визначали згідно з методикою, викладеною в Державній фармакопеї України.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми проаналізували вітчизняні, європейські й міжнародні нормативні документи. Порівняльні результати занесли в таблицю, де подано основні групи протимікробних препаратів. На основі офіційної звітності Держветфітослужби

України встановлено, що вітчизняна нормативна база контролює лише 4 антибіотики, тоді як у країнах ЄС визначають 74 препарати (табл. 1).

Як видно з табл. 1, одиниці вимірювання залишкової кількості антибіотиків в Україні відрізняються від таких у 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 (0,01 ОД/г), щодо яких у нормативній документації чітко зазначена допустима їх концентрація в харчових продуктах. А такі антибіотики, як триметоприм, амоксицилін, фуразолідон, цефазолін, сульфадиметоксин, неоміцин, енрофлоксацин та інші, що зустрічаються у вітчизняній та імпортованій продукції, не контролюються, допустимі норми в продуктах щодо них не визначені.

Таблиця 2 – Чутливість тест-штамів до протимікробних препаратів

Антибіотик	Концентрація антибіотика в живильному середовищі, ОД/мл, мкг/мл									
	Діаметр зони затримки росту, мм (± 1 мм)									
	L2	537	НВ	6633	9341	10240	11778	209 P	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	–
Сульфадиметоксин	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

Міжнародна законодавча база суворо забороняє присутність у харчових продуктах хлорамфеніколу, тоді як в Україні його допустима концентрація становить 0,01 мг/кг.

Згідно зі звітом щодо результатів виконання Плану державного моніторингу залишків ветпрепаратів і забруднювачів у меду за 2011 р. із досліджених 35 проб меду на наявність хлорамфеніколу була позитивною

1 проба; із 150 проб були позитивними: на тетрациклін – 2 проби; хлортетрациклін – 2; окситетрациклін – 3; доксициклін – 1; сульфадиметоксин – 1; сульфаметазин – 2; ністатин – 1 проба.

За результатами моніторингу відібрали основні групи антибіотиків для визначення їх залишкової кількості в сировині й продукції тваринного походження з метою розширення спектра визначення ПМП біологічним методом.

Критерієм чутливості мікроорганізмів до антибіотика слугувала розрахована на 1 мл живильного середовища мінімальна концентрація, яка інгібує ріст збудника за стандартних умов виконання досліджу.

Тест на чутливість наших досліджуваних мікроорганізмів щодо антибіотиків (концентрація 0,1 мкг/мл) дав можливість визначити найбільш чутливі штам. Результати наведено в табл. 2.

Згідно з С.М. Навашиною, І.П. Фоміною (1982) при зоні затримки росту діаметром до 10 мм штам вважають малочутливим. Зони діаметром більше 10 мм вказують на чутливість штаму

до певної концентрації протимікробного препарату.

З табл. 2 видно, що *Bacillus subtilis* var. L2 чутливий до стрептоміцину (діаметр зони 15,0 мм) і високочутливий до триметоприму (25,0), неоміцину (20,0); *Micrococcus luteus* 10240 малочутливий до ампіциліну (9,7) й нітрофурантоїну (8,0) та високочутливий до амоксициліну (25,2), хлорамфеніколу (20,0), цефазоліну (20,1); *Bacillus cereus* 11778 високочутливий до тетрацикліну (28,0); *Bacillus stearothermophilus calidolactis* C-953 виявив високу чутливість до пеніциліну (28,0), ампіциліну (30,0), хлорамфеніколу (23,0), цефтріаксону (21,0), фуразолідону (16,5); *Streptococcus thermophilus* високочутливий до пеніциліну (24,0), ампіциліну (25,0), бацитрацину (17,0); *Bacillus subtilis* 6633 досить чутливий до еритроміцину (16,3); *Micrococcus luteus* 9341 високочутливий до пеніциліну (18,0), ампіциліну (20,0), хлорамфеніколу (19,0); *Bacillus cereus* var. *mycoides* НВ виявився чутливим до цефазоліну (15,0), високочутливим до пеніциліну (19,5), ампіциліну (20,3); *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537 високочутливий до тетрацикліну (19,5), канаміцину (17,5); *Staphylococcus aureus* 209 P високочутливий до еритроміцину (17,8), пеніциліну (18,1), хлорамфеніколу (18,1 мм).





Таблиця 3 – Нижня межа чутливості тест-культур до антибіотиків

Антибіотик	Концентрація антибіотика в живильному 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
Сульфадиметоксин	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

Наступним етапом нашої роботи було тестування відібраних мікроорганізмів за чутливістю до досліджуваних антибіотиків. Тест-культури мають бути чутливими до максимально малих концентрацій антибіотиків у середовищі.

Ступінь чутливості мікроорганізмів ми визначали методом дифузії в агар. Як живильне середовище використовували агар Мюллера – Хінтона.

Кількість пробірок з розведеним антибіотиком готували з таким розрахунком, щоб у нашому спектрі були присутні його концентрації 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 табл. 3.

Із табл. 3 видно, що мікроорганізми по-різному виявляли чутливість до досліджуваних антибіотиків. До пеніцилінової групи високочутливі *Bacillus stearothermophilus calidolactis* C-953, *Streptococcus thermophilus*. Штами мають широкий спектр чутливості майже до всіх груп протимікробних препаратів, окрім триметоприму. Високочутливі

до цефтріаксону (0,003 мкг/мл), сульфадиметоксину (0,008), цефазоліну (0,01) й тетрацикліну (0,01 і 0,5 мкг/мл).

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

Штам *Bacillus subtilis* var. L2 єдиний з усіх досліджуваних виявився чутливим до найменшій концентрацій гентаміцину, неоміцину, триметоприму, стрептоміцину, а також досить чутливим до фуразолідону (1 мкг/мл).

Bacillus cereus var. *mycoides* 537 має широкий спектр чутливості до стрептоміцину, тетрацикліну й досить чутливий до канаміцину (0,001 мкг/мл).

Bacillus cereus var. *mycoides* НВ високочутливий до цефазоліну (0,003 мкг/мл), як і *Micrococcus luteus* 10240, чутливий до еритроміцину й антибіотиків пеніцилінової групи.

Bacillus subtilis 6633 досить чутливий до еритроміцину – єдиний з усіх дав чіткі зони до мінімальної концентрації цього антибіотика.

Штам *Micrococcus luteus* 9341 має широкий спектр чутливості до різних груп антибіотиків, але найбільше проявив себе щодо хлорамфеніколу (0,001 мкг/мл), еритроміцину, бацитрацину й пеніцилінової групи.

Micrococcus luteus 10240 також має широкий спектр чутливості, але найбільше виявив себе щодо бацитрацину, хлорамфеніколу, амоксициліну й цефтріаксону.



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

Досліджувані штами охоплюють весь спектр широко використовуваних антибіотиків. Вони найбільш чутливі до різних груп протимікробних препаратів.

За результатами чутливості досліджуваних мікроорганізмів до різних груп протимікробних препаратів можна підібрати еталонні культури тест-штамів індивідуально до окремих антибіотиків.

На підставі даних, отриманих під час визначення чутливості різних штамів мікроорганізмів до мінімальних концентрацій основних протимікробних препаратів, запропоновано засоби стандартизації контролю залишкових кількостей ПМП з подальшою можливістю їх диференціації в продуктах тваринного походження:

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

– *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537 – для визначення аміноглікозидів (стрептоміцин), пеніцилінів (бензилпеніцилін, ампіцилін), аміноглікозидів (канаміцин);

– *B. cereus* HB – для визначення макролідів (еритроміцин), пеніцилінів, цефалоспоринів (цефазолін);

– *Bacillus subtilis* 6633 – для визначення макролідів (еритроміцин);

– *Micrococcus luteus* 9341 – для визначення пеніцилінів, хлорамфеніколу, макролідів, сульфаніламідів (сульфадиметоксин);

– *Micrococcus luteus* 10240 – для визначення пеніцилінів, тетрациклінів, хлорамфеніколу, бацитрацину, цефалоспоринів (цефазолін);

– *Bacillus cereus* 11778 – для визначення антибіотиків тетрациклінового ряду;

– *Staphylococcus aureus* 209 – для визначення макролідів (еритроміцин), пеніцилінів, хлорамфеніколу;

– *Bacillus calidolactis* C-953 – для визначення нітрофуранів (фуразолідон, нітрофурантоїн), цефалоспоринів (цефтріаксон), пеніцилінів, хлорамфеніколу, сульфаніламідів (сульфадиметоксин);

– *Streptococcus thermophilus* – для визначення нітрофуранів, пеніцилінів, аміноглікозидів (стрептоміцин), бацитрацину.

ВИСНОВКИ

1. Здійснено моніторинг залишків ПМП у сировині й продукції тваринного походження.

2. За результатами моніторингу створено перелік ПМП, залишки яких зустрічаються в сировині й продукції тваринного походження, з метою розширення спектра визначення ПМП біологічним методом.

3. Вивчено чутливість мікроорганізмів до основних груп антибіотиків, які використовуються у ветеринарії, з метою підбору уніфікованих чутливих тестових систем до широкого спектра зазначених речовин.

4. Встановлено межі чутливості десяти штамів мікроорганізмів до основних груп антибіотиків, які найчастіше використовуються у ветеринарії.

5. Підібрано еталонні культури тест-штамів індивідуально до окремих антибіотиків різних груп протимікробних препаратів.

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

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ 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. **Директива** № 2377/90 від 26 червня 1990 р. про заходи, щодо встановлення мінімально допустимих концентрацій ветеринарних лікарських препаратів в продуктах тваринного походження. – 1990. – 26 с. ((ЕС) № 1875/2004 (ОJ№. L 326, 29.10.2004, P. 19)).
3. **Кальницкая О.И.** Антибиотики в мясных продуктах питания / О.И. Кальницкая,

А.П. Мулюкова // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Матер. науч.-практ. конференции. – СПб., 2005. – С. 88–89.

4. **Кальницкая О.И.** Уровень обнаружения антибиотиков в продуктах убоя, полученных из отечественного и импортного сырья / О.И. Кальницкая, А.Н. Туник, Б.В. Уша // Ветеринария. – 2007. – № 4. – С. 48–53.
5. **Навашин С.М.** Рациональная антибиотикотерапия / С.М. Навашин, И.П. Фомина. – М.: Медицина, 1982. – С. 4–7, 421–427.
6. **Tollefson L.** Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance / L. Tollefson, S.F. Altekruze, M.E. Potter // Rev. Sci. Tech. – 1997. – V. 16. – P. 709–715.

Одержано 6.06.2013

Разработка средства контроля биологическим методом остаточных количеств противомикробных препаратов в продукции животноводства. А.Н. Головки, Н.Г. Пинчук, А.В. Дмитриева, Т.Ф. Киселева

Приведены результаты разработки биологических средств контроля остаточных количеств противомикробных препаратов в продуктах животного происхождения согласно требованиям отечественной и международной нормативно-законодательной базы. В практику ветеринарной медицины введен набор тестовых штаммов микроорганизмов для определения остаточного количества ПМП в сырье и продуктах животного происхождения с учетом чувствительности тестовых микробов к широкому спектру антибиотиков.

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. ◉