

УДК 619:614.31:615.33:637.56

ЗАСТОСУВАННЯ ЕКСПРЕС-МЕТОДУ «PREMI®TEST» ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ У М'ЯСІ РИБИ

Петров Р.В., Фотіна Т.І.

Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна, e-mail: romanpetrov1978@mail.ru

У статті наведені дані щодо використання експрес-методу визначення антимікробних препаратів у рибі за допомогою тест-системи «Premi®Test» виробництва R-Biopharm AG. При порівняльній оцінці стандартного методу визначення наявності антибактеріальних препаратів шляхом дифузії в агар та експрес-методу, тест-система «Premi®Test» показала високу чутливість до визначення в м'ясі риби сульфаніламідів, тетрациклінів, макролідів, аміноглікозидів та антибіотиків пеніцилінового ряду, і не поступається стандартному методу дифузії в агар. Експрес-метод визначення залишків антибактеріальних препаратів в рибі «Premi®Test» може бути використаний для поточного аналізу на виробництві та при проведенні ветеринарно-санітарної оцінки риби в умовах державних лабораторій ветеринарно-санітарної експертизи на агропродовольчих ринках.

Ключові слова: риба, безпека, антибактеріальні препарати, *Bacillus stearothermophilus*, «Premi®Test».

Забезпечення населення екологічно чистими продуктами тваринництва одна з головних задач що стоїть перед агропромисловим комплексом України. Суттєву роль у вирішенні даної проблеми займає рибицтво, яке за короткий термін може забезпечити населення своєю продукцією. На заваді розвитку рибицтва стоять хвороби інфекційної етіології, для лікування та профілактики яких широко застосовують антибактеріальні препарати [2, 3, 8]. Використання продукції рибицтва з наявністю даних препаратів на рівні або вище максимально-допустимих рівнів (МДР) заборонена і може призвести при споживанні такої продукції до алергій, ідіосинкразій, дисбактеріозів, утворення антибіотикостійких штамів мікроорганізмів у людей, що у подальшому приводить до послаблення загальної резистентності людського організму [1, 4, 5, 7].

Для контролю за наявністю залишків антибактеріальних препаратів у продукції тваринного походження використовують мікробіологічні, фізико-хімічні, імунологічні, біологічні та інші методи. Найбільш розповсюдженими є мікробіологічні методи контролю, які доволі дешеві, прості у виконанні та забезпечують отримання результату в короткі терміни. Вони дають можливість встановити наявність у продукції антимікробних речовин на рівні МДР або рівнях, що перевищують МДР [1, 2, 6].

Найбільш поширеним є метод дифузії в агар з використанням однієї з паспортизованих тест-культур мікроорганізмів *Sar. lutea*, *St. aureus*, *Bac. subtilis*. В основі методу дослідження продуктів забою тварин на наявність антибіотиків лежить здатність багатьох видів антибіотиків затримувати ріст мікроорганізмів [2]. Недоліком даного методу, є достатньо тривалий час для постановки, проведення та обліку реакції (20–24 години), що ускладнює використання даної реакції при промислому контролі риби та рибопродукції та в умовах державних лабораторій ветеринарно-санітарної експертизи на ринку.

Виходячи з вищевикладеного існує нагальна потреба у впровадженні експрес-методу виявлення антибактеріальних препаратів у рибі.

Мета роботи: застосувати експрес-метод для виявлення антибактеріальних препаратів у рибі з використанням тест-системи «Premi®Test».

Матеріали та методи. Дослідження проводились на базі кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва факультету ветеринарної медицини Сумського національного аграрного університету.

Для проведення досліджень було сформовано 5 груп коропів віком два роки вагою 240 ± 14 г по 12 особин ($n=12$). Кожній особині був наданий номер за допомогою бірки. У досліді використовували коропів отриманих з Сумського рибкомбінату, яким попередньо не задавали антибактеріальні препарати. Риба містилась в акваріумах ємністю 100 л. за температури 19–20 °С. За допомогою штучної аерації концентрація кисню у воді підтримувалась на рівні 7–10 г/м³.

Кожній групі вводили п'ять різних антимікробних препаратів: сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін і гентаміцин (таблиця 1).

Таблиця 1 – Схема введення препаратів для проведення дослідів

№ особини у групі / Препарат	1-4	5-8	9-12	Спосіб та кратність введення	МДР мг/кг
Сульфадимезин	50 мг/кг	100 мг/кг	200 мг/кг	2 рази на добу п/о з 1% крохмальним клейстером	100 мг/кг
Окситетрациклін	50 мг/кг	100 мг/кг	200 мг/кг	1 раз на добу в/м	100 мг/кг
Тілозин	50 мг/кг	100 мг/кг	200 мг/кг	1 раз на добу в/м	100 мг/кг
Амоксицилін	25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг	1 раз на добу в/м	50 мг/кг
Гентаміцин	25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг	1 раз на добу в/м	50 мг/кг

Розділ 2. Якість і безпечність продукції тваринництва. Ветеринарно-санітарна експертиза.

Для постановки реакції дифузійним методом попередньо, перед дослідженням, тест-культуру *Bac. subtilis* вирощували на м'ясо-пептоному бульйоні протягом доби за температури 37 °С. На пластинчастий м'ясо-пептонний агар пастерівською піпеткою наносили 2–3 краплі бульйонної тест-культури мікроорганізмів і ретельно розподіляли по його поверхні. Потім на поверхню агару на однаковій відстані один від одного і від країв чашки Петрі вміщували три досліджувані проби м'яса масою 2–3 г і паперовий диск, що містить 0,25 ОД пеніциліну. Чашку ставили спочатку в холодильник за температури 4–5 °С на 5 год. (для дифузії антибіотиків з м'яса риби в поживне середовище), а потім у термостат за температури 37 °С на 15–20 год. При наявності антибіотиків у пробі навколо шматочка м'яса риби виявляли зону затримки росту мікроорганізмів. Для контролю її порівнювали із зоною затримки росту навколо паперового диска, просоченого пеніциліном.

Для постановки реакції експрес-методом «Premi@Test» водну витяжку (1:10) з фаршу м'яса риби поміщали в готові до використання пробірки, давали настоятися 20 хв. за кімнатної температури для проходження процесу дифузії, після цього витяжку видаляли і промивали 3 рази дистильованою водою. Потім пробірку поміщали в термостат за температури 64 °С протягом 3 годин. Для врахування результатів реакції порівнювали колір індикатору: при відсутності у зразках антимікробних препаратів, спори проростають і розвиваються спричиняючи окиснення середовища та зміну кольору (жовтий колір); при наявності залишків антимікробних препаратів, бактеріальний ріст не буде відбуватися, а фіолетовий колір буде вказувати на присутність антибіотиків на рівні або вище межі чутливості тесту.

Результати досліджень. У своїх дослідах ми використали препарати які найбільш розповсюджені в риборибництві та застосовуються для лікування та профілактики хвороб риби: сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін і гентаміцин.

Через добу після введення препаратів риба була забита, а зразки м'яса використані для дослідження в них залишкових кількостей антибактеріальних препаратів методом дифузії в агар та експрес-методом «Premi@Test».

У результаті досліджень дифузійним методом залишків антибактеріальних препаратів у м'ясі коропа були отримані дані, що відображені в табл. 2.

Таблиця 2 – Визначення в рибі антибактеріальних препаратів за допомогою методу дифузії в агар (n=4)

№ особи у групі / Препарат	1-4	5-8	9-12
	кількість позитивних результатів / усього проб (%)		
Сульфадимезин	0/4 (0%)	2/4 (50%)	4/4 (100%)
Окситетрациклін	1/4 (25%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)
Тілозин	2/4 (50%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)
Амоксицилін	2/4 (50%)	3/4 (75%)	4/4 (100%)
Гентаміцин	0/4 (0%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)
	0,5×МДР	1,0×МДР	2,0×МДР

Аналізуючи дані, наведені в табл. 2 встановлено, що дифузійний метод виявлення антимікробних препаратів у рибі не в усіх випадках виявився ефективним. За наявності в м'ясі риби препаратів у половинній кількості від максимально-допустимих рівнів дифузійним методом не виявляли сульфадимезин і гентаміцин; у половині випадків визначався тілозин та амоксицилін; у 25 % випадків визначався окситетрациклін. За умови наявності сульфадимезину на рівні МДР лише в 50 % випадків за допомогою даного методу виявляли препарати в м'ясі риби; окситетрациклін і тілозин визначали зі 100 % ефективністю; гірше визначався амоксицилін – в 75 % випадків; а гентаміцин – лише в 25 % випадків був отриманий позитивний результат.

При збільшенні концентрації препаратів до двократного перевищення МДР – даний метод дає можливість зі 100 % ефективністю виявити сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін, але гентаміцин лише у 25 % випадків.

Витрата часу за умови проведення дослідження по виявленню залишків антибактеріальних препаратів дифузійним методом, не враховуючи підготовчого етапу, склала 24 години.

Результати досліджень зразків м'яса риби експрес-методом «Premi@Test» наведені в табл. 3.

Таблиця 3 – Визначення в рибі антибактеріальних препаратів за допомогою експрес-методу «Premi@Test» (n=4)

№ особи у групі / Препарат	1-4	5-8	9-12
	кількість позитивних результатів / усього проб (%)		
Сульфадимезин	0/4 (0%)	2/4 (50%)	4/4 (100%)
Окситетрациклін	2/4 (50%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)
Тілозин	3/4 (75%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)
Амоксицилін	4/4 (100%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)
Гентаміцин	0/4 (0%)	1/4 (25%)	3/4 (75%)
	0,5×МДР	1,0×МДР	2,0×МДР

Аналізуючи дані, наведені в табл. 3 встановлено, що при застосуванні «Premi®Test» ефективно виявляли наявність антибактеріальних препаратів у м'язах при половинній концентрації МДР у пробах м'язової тканини риби: окситетрацикліну (50 %), тілозину (75 %), амоксициліну (100 %); тест був нечутливий до сульфадимезину та гентаміцину.

За використання «Premi®Test» ефективно виявляли наявність у м'язах риби на рівні 1,0×МДР таких препаратів, як окситетрациклін (100 %), тілозин (100 %) та амоксицилін (100 %); сульфадимезин – лише в половині випадків, а гентаміцин – у 25 % випадків.

На рівні двократного перевищення максимально-допустимих рівнів за допомогою експрес-тесту виявляли всі зазначені препарати на рівні 100 %, крім гентаміцину, його рівень виявлення склав 75 %.

Витрата часу за умови проведення дослідження експрес-методом склала чотири години.

Отже нами доведено, що експрес-метод визначення залишків антибактеріальних препаратів в рибі «Premi®Test» є ефективним. При використанні даного методу значно скорочується час на проведення досліджень, він простий у використанні, не поступається по своїй чутливості методу дифузії в агар.

Висновки. Обґрунтована ефективність застосування експрес-методу визначення антибактеріальних препаратів у рибі за допомогою тест-системи «Premi®Test». У м'язах риби на рівні МДР було виявлено такі препарати, як окситетрациклін, тілозин та амоксицилін (100 %); на рівні двократного перевищення МДР – сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін на рівні 100 %; гентаміцин – у 75 % випадків.

Доведено, що експрес-метод для визначення антибактеріальних препаратів «Premi®Test» може бути використаний для поточного аналізу риби та рибної сировини в умовах виробництва. Його використання порівняно з дифузійним методом скорочує витрату часу до 4 годин на 25 проб.

Перспективи подальших досліджень. У перспективі планується розробити схему лікування та профілактики бактеріальних хвороб риби у промисловому рибництві з використанням ефективного екологічно чистого препарату.

Список літератури

1. Бремнер Г. Аллан Безопасность и качество рыбо- и морепродуктов [Текст] / Г. Аллан Бремнер; [пер. с англ. В. Широкова; науч. ред. Ю.Г. Стоянова]. – СПб.: Профессия, 2009. – 512 с.
2. Давыдов О.Н. Ветеринарно-санитарный контроль пищевых гидробионтов [Текст] / Давыдов О.Н., Абрамов А.В., Темниханов Ю.Д. – Черкассы, изд-во «АНТ», 2007 – 458 с.
3. Давыдов О.Н. Биологические препараты и химические вещества в аквакультуре [Текст] / Давыдов О.Н., Абрамов А.В., Куровская Л.Я. – К.: Логос, 2009. – 307 с.
4. Калашникова А. Биологическая опасность рыбы и рыбной продукции для потребителя [Текст] / А. Калашникова // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2009. - № 7. - С. 7-8
5. Косенко Ю.М. Моніторинг залишків ветеринарних препаратів у харчових продуктах [Текст] / Ю.М. Косенко, В.І. Ткаченко, О.В. Лапін // Наук. Вісн. Львів. держ. акад. вет. медицини. - М-во аграр. політики України. – Л., 2002. – Т. 4 (№2), ч.5. – С. 202-207.
6. Обов'язковий мінімальний перелік досліджень сировини, продукції тваринного та рослинного походження, комбікормової сировини, комбікормів, вітамінних препаратів та ін., які слід проводити в державних лабораторіях ветеринарної медицини і за результатами яких видається ветеринарне свідоцтво (Ф-2) [Текст] : Нормативні директивні правові документи. – –К., 2004. – С. 29-30.
7. Про безпечність та якість харчових продуктів [Текст] : Закон України // Відомості Верховної Ради України. – 1998. - №19. – С. 98.
8. Скурат Э.К. Новые антибиотики для профилактики и лечения аэромоназов карпов в прудовых хозяйствах [Текст] / Э.К. Скурат, В.А. Сиволюцкая, Е.И. Гребнева // Вопросы рыбного хозяйства Белоруссии. - Академия аграрных наук. Минск. - 1996. - Вып. 14. - С. 101-104.

OF RAPID METHOD «PREMI®TEST» FOR DETECTION OF RESIDUES OF ANTIBACTERIAL DRUGS IN THE FLESH

Petrov R.V., Fotina T.I.

Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

To justify the use of rapid detection method antimicrobials in fish using the test system «Premi®Test».

Materials and methods. Carp asked five different antimicrobials in three concentrations: sulfadimezin (50, 100, 200 mg/kg) oksitetratsyklin (50, 100, 200 mg/kg) tilozyn (50, 100, 200 mg/kg), amoxicillin (25, 50, 100 mg/kg) and gentamicin (50, 100, 200 mg/kg). Carp were killed in a day, and meat samples were used to identify antibacterial drugs by diffusion and rapid method.

The results. «Premi®Test» effectively showed the presence of fish muscle at the level of MRL drugs such as oksitetratsyklin, tilozyn and amoxicillin (100 %); sulfadimezin showed only 50 % and gentamicin only 25 % of cases. At the level of excess double MRL rapid test showed all these drugs at 100 %, including gentamicin, its detection rate was 75 %. Time spent subject to express research method was four hours.

Rapid method for determination of residues of antibacterial agents in fish «Premi®Test» has shown itself effective. When using this method significantly reduces the time to research, it is easy to use, and not inferior to its sensitivity agar diffusion method.

Conclusions. 1. The effectiveness of the use of rapid method for determining antimicrobial drugs in fish using the test system «Premi®Test», which detects muscle of fish at MRL drugs such as oksitetratsyklin, tilozyn and amoxicillin (100 %); at dvochkратноho excess MRL rapid test showed sulfadimezin, oksitetratsyklin, tilozyn, amoxicillin at 100 %; gentamicin was detected in 75 % of cases.

2. It is proved that a rapid method for the determination of antibacterial drugs «Premi®Test» can be used to analyze the current fish and fish raw materials in production, the use of which in comparison with diffusion method reduces time spent 4 hours in 25 samples.

Prospects for further research. There are plans to develop a scheme for the treatment and prevention of bacterial diseases of fish in the industrial fishery using efficient, environmentally friendly product.

Keywords: fish, security, antibiotics, *Bacillus stearothermophilus*, «Premi®Test».

УДК 619:615.37

ЗНАЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В РЕШЕНИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ

Самуйленко А.Я., Еремец В.И., Гринь С.А., Раевский А.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Российская Федерация, e-mail: vnitibp@mail.ru

Рассмотрено значение биологической промышленности в оздоровлении окружающей среды, продовольственной безопасности, снижении влияния негативных факторов на мутационные процессы клеток и вирусов, а также пути развития промышленности для повышения эффективности функционирования агропромышленного комплекса страны.

Ключевые слова: биотехнология, биологическая промышленность, экология, концепция.

Современный этап развития цивилизации связан с интенсивным загрязнением окружающей среды. Значительный вклад в ее защиту вносит биотехнология, с достижениями которой связано улучшение состояния медицины, ветеринарии и животноводства стран [1–2]. На Земле почти не остается места, где бы люди и животные не подвергались действию всевозможных неблагоприятных факторов, различающиеся по характеру и степени воздействия на микро- и макроорганизмы. К ним относятся абиотические факторы физической, химической и биологической природы; антропогенные, связанные с деятельностью человека, и биотические формы взаимодействия человека с внешней средой [3]. Особенно важно, что ухудшение состояния естественной среды обитания приводит к увеличению образования мутаций на уровне клеток животных и растений, вирусов и бактерий в процессе их деления, когда они особенно неустойчивы и подвержены перерождению.

Увеличение интенсивности мутационных процессов на геномном уровне (геномные мутации) объясняет факт появления большого количества новых штаммов (серотипов) микроорганизмов, вызывающих инфекционные болезни. Например, на сегодняшний день регистрируется более 70 штаммов вируса ящура, свыше 2,5 тысяч штаммов сальмонелл, несколько тысяч штаммов эшерихий и т.д. Мутированные штаммы микроорганизмов могут отличаться по биологическим свойствам и вызывать различную клинику заболеваний, что значительно затрудняет борьбу с ними.

Влияние мутагенов на клетку не только приводит к увеличению мутаций, но и к снижению защитных сил макроорганизма, ослаблению иммунитета. При этом меняется «генетическая матрица» клетки, которая начинает выполнять патологическую программу и плодить себе подобных. В результате возникают онкогенные заболевания, всплеск которых мы наблюдаем в настоящее время, несмотря на бурное развитие фармакологии и медицины.

На наш взгляд, решающим фактором дальнейшего благополучного существования человечества является обеспечение таких условий на Земле, которые противодействуют увеличению влияния мутагенов на клетки на геномном уровне [4].

В последние десятилетия, благодаря бурному развитию иммунологии, расширились представления о важности и роли иммунной системы в сопротивлении макроорганизма патогенам различной этиологии. Агрессивные факторы внешней среды, не только приводят к мутационным процессам, но и оказывают многофакторное повреждающее действие на иммунную систему, влияют на развитие вторичного иммунодефицита, что делает иммунный ответ малоэффективным. Сохранение работоспособной иммунной системы – задача иммунокорректирующей терапии [5].

Глобализация торговли продуктами питания, предусматривающая быстрое перемещение животноводческой продукции из одной страны в другую, обусловила тенденцию повышения риска распространения заразных болезней, в том числе опасных для человека. При этом процесс очевидного бурного роста населения планеты, заставляет производителей сельскохозяйственной продукции увеличивать поголовье продуктивных животных, повышать их продуктивность и снижать потери от болезней [6].

Развитие животноводства и продовольственной безопасности страны напрямую зависит от успешной реализации целого комплекса мероприятий, куда входят и ветеринарно-санитарные мероприятия, диагностические обследования, вакцинопрофилактика, лечение болезней лекарственными средствами, иммунокоррекция и прочее. В связи с этим для получения продукции, конкурентоспособной на мировом рынке, развитие современной биологической промышленности должно быть основано на достижениях биологических и технических наук, эффективном переводе результатов фундаментальных