

Формирование устойчивости микроорганизмов при внесении антибиотиков в корма

О.Е. Мережко, к.б.н., Н.Б. Станишевская, преподаватель, НОУ ВПО МТИ ВТУ, филиал в г. Оренбурге

В последнее десятилетие крайне актуальна проблема увеличения антибиотикорезистентных форм патогенных микроорганизмов и, как следствие, снижения эффекта от лечения противомикробными препаратами.

Терапевтический эффект применяемых антибактериальных средств заключается в угнетении метаболизма возбудителя инфекционного заболевания. Процессы блокировки метаболизма происходят при связывании антибиотика со структурами клетки мишени, в качестве которых могут выступать клеточная стенка, рибосомы или генетический аппарат прокариотного организма [1].

Массовое и беспорядочное применение антибиотиков, в животноводстве, в частности, создаёт благоприятные условия для быстрой эволюции патогенности и вирулентности микроорганизмов и формирования у них антибиотикорезистентности.

Несмотря на введённый в Евросоюзе запрет на использование антибиотиков в кормах, практически все зарубежные компании, поставляющие сырьё для комбикормов в РФ, добавляют в эти корма различные противомикробные препараты для ускорения роста животных, снижения коэффициента конверсии кормов и сокращения сроков откорма, не указывая на проводимые действия в сопроводительном удостоверении [2].

Наличие в комбикормах даже остаточных количеств антибиотиков может вызвать и уже вызывает различные нарушения здоровья людей, употребивших их в пищу, как сейчас, так и спустя несколько лет.

Всемирная организация здравоохранения ещё в 2000 г. рекомендовала наложить запрет на использование в животноводстве антибактериальных препаратов, применяемых для лечения людей.

Россия, в отличие от стран Евросоюза, не накладывала запрет на добавление антибиотиков в корма, но их применение пытаются регулировать для обеспечения безопасности продукции для здоровья населения. Это означает, что остаточное содержание потенциально опасных препаратов в продуктах животноводства должно быть ниже уровня, определённого законодательством [3, 4].

В Российской Федерации действуют санитарно-эпидемиологические правила и нормативы Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов (СанПиН 2.3.2.1078-01), в которых регламентируется содержание ряда антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения.

Несмотря на актуальность проблемы, попытки оценки её масштабов носят фрагментарный характер.

В настоящее время для лечения и профилактики заболеваемости птиц и мясных пород крупного рогатого скота используют окситетрациклин, хлорамфеникол (левомицетин), для молочных пород — стрептомицин, тетрациклин, ампициллин, пенициллин, гризин и бацитроцин [5].

В соответствии с российским законодательством вышеперечисленные антибиотики не должны определяться при проверке продукции животноводства, но в реальности их количество может быть ниже порога чувствительности измерительных приборов. Например, если прибор измеряет с точностью до 0,04 мг/кг, а количество антибиотика будет равно 0,03 мг/кг, прибор его не обнаружит и продукт будет признан годным.

Это веский повод для тщательного контроля сырья и продуктов животного происхождения и определения в них остаточных количеств антибиотиков.

Объекты и методы исследования. Мониторинг обнаружения остаточных количеств антибиотиков в продуктах животного происхождения проводили

методом отбора образцов на предприятиях и в торговой сети г. Оренбурга.

Исследованию подвергали говядину (производство РФ, Польша), печень свиную (РФ), ножки куриные (РФ, Китай, США), свинину (РФ, Германия), яйца куриные (РФ), яйца перепелиные (РФ), яичный порошок (РФ, Бразилия), молоко, сыры, брынзу (РФ, Литва, Украина), мёд (РФ) — всего 561 образец.

Пробы мяса отбирали по ГОСТу 7269-79 «Мясо. Методы отбора проб для органолептического исследования».

Данные по содержанию остаточных количеств антибиотиков были получены микробиологическим методом диффузии в агар (МУ 3049-84), экспресс-методом определения антибиотиков в пищевых продуктах (МУК 4.2.026-95), методом ИФА и жидкостной хроматографии (МУК 4.1.1912-04).

Подготовку проб для исследования проводили в соответствии с Методическими указаниями по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства (№ 3049-84), согласно экспресс-методу определения антибиотиков в пищевых продуктах (МУК 4.2.026-95) и методическим указаниям по определению остаточных количеств левомицетина (хлорамфеникола) в продуктах животного происхождения методом жидкостной хроматографии и иммуноферментного анализа (МУК 4.1.1912-04).

Для количественного определения хлорамфеникола (левомицетина) и окситетрациклина использовали принцип твердофазного конкурентного ИФА на полистироловых планшетах [4].

Метод основан на процессах конкуренции между свободным антибиотиком и антибиотиком, адсорбированном на твёрдой фазе (лунке планшета) в составе белкового конъюгата. Конкуренция идёт за центры связывания специфичных к тетрациклину антител во вносимом растворе. После отделения не успевших связаться реагентов количество антител, прореагировавших с адсорбированным антигеном, определяют с помощью вторичных антивидовых антител, помеченных ферментом — пероксидазой хрена.

Количество определяемого антибиотика, содержащегося в анализируемой пробе, обратно пропорционально регистрируемой оптической плотности продукта ферментативной реакции [1].

Измерения проводили на планшетном фотометре вертикального сканирования «Мультискан» с использованием фильтра, соответствующего длине волны 450 нм. Использовали тест-системы RIDASCREEN левомицетин и RIDASCREEN, тетрациклин (ООО «Стайлаб» R-Biopharm).

Пределы обнаружения для тетрациклина составляют 6,0 мкг/кг, хлорамфеникола (левомицетина) — 0,025 мкг/кг.

В пробы для определения левомицетина вошли говядина 1-го сорта, свинина 1-го сорта, фарш для

докторской колбасы высшего сорта, яйцо йодированное 1-й категории, мёд с частных пасек. Пробы молока, купленного в торговой сети г. Оренбурга, подвергались анализу на присутствие тетрациклина. Результаты анализов сравнивали с пробами молока и говядины, предварительно загрязнённых 50 мкг/л тетрациклина.

Определение остаточных количеств тетрациклина и левомицетина проводили методом ИФА (МУК 4.1.2158-07. Утв. главным санитарным врачом РФ 18.01.2007) с последующим количественным определением на жидкостном хроматографе с УФ-детектором, при длине волны 278 нм для левомицетина и 355 нм для тетрациклина.

Термическую обработку мясных продуктов, включающую осядку, подсушку, обжарку, варку и охлаждение, проводили согласно Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов.

После термической обработки пробы говядины, свинины и мяса птицы повторно исследовали на содержание остаточных количеств антибиотиков.

Для разрушения молекул антибиотиков куски мяса вымораживали в морозильной камере при температуре — 18°C в течение 2 сут. Анализ на определение остаточного количества антибиотиков проводили не только на поверхности куска, но и на глубине 3 см.

Для количественного и качественного определения антибиотиков в молоке использовали новый экспресс-тест Betastar®4D. Тест внесён в ГОСТ 32219-2013 «Молоко и молочные продукты. Иммуноферментные методы определения наличия антибиотиков».

Для большей достоверности был проведён анализ проб молока с предварительно внесёнными антибиотиками — левомицетином, окситетрациклином и стрептомицином.

Пробы молока были подвергнуты пастеризации, каждая в объёме 50 мл.

Стерилизацию образцов молока проводили нагреванием паром до 75°C, далее на 5–6 с. — до 140°C и в течение последующих 4 с выдерживали под высоким давлением.

Для определения антибиотикорезистентности бродильных микроорганизмов в образцы молока добавляли ацидофильную закваску и после появления сгустка подвергали исследованию.

Результаты исследований. При исследовании ножек куриных (РФ, Китай, США), говядины (РФ, Польша), свинины (РФ, Германия), яиц куриных (РФ), яичного порошка (Бразилия), молока и молочных продуктов (РФ, Литва, Украина) было выявлено 56 случаев превышения содержания антибиотиков (таб.).

Антибиотики в остаточных количествах были выявлены в говядине и свинине (Польша) и мышечной ткани птицы импортного происхождения (США). Молочная продукция и яйца куриные, за-

Антибиотики в продуктах животного происхождения в количествах, превышающих требования СанПиН 2.3.2.1078-01

Объект исследования	Страна происхождения	Антибиотик	Количество положительных проб
Ножки куриные	РФ, США	тетрациклин стрептомицин	7 1
Печень свиная	РФ	тетрациклин	5
Фарш говяжий	РФ	тетрациклин стрептомицин	3 1
Консервы говяжьи	Польша	тетрациклин	6
Яйца куриные	РФ	тетрациклин стрептомицин	1 1
Яичный порошок	Бразилия	тетрациклин стрептомицин	3 3
Говядина	Польша	тетрациклин	1
Свинина	Германия	тетрациклин	1
Говядина замороженная	Польша	гризин бацитрацин	2 1
Молоко	РФ	пенициллин стрептомицин тетрациклин	2 2 1
Сметана	РФ	стрептомицин тетрациклин	2 2
Мёд	РФ	–	0
Сыр твёрдый	РФ, Литва, Украина	левомицетин стрептомицин тетрациклин	1 1 2
Брынза	РФ, Украина	пенициллин стрептомицин тетрациклин левомицетин	1 1 1 1
Всего		57 случаев	

грязнённые антибиотиками, были отечественного производства.

В куриных ножках, говядине, свинине чаще других определялись антибиотики тетрациклинового ряда. Следующим по частоте встречаемости был стрептомицин.

Из образцов замороженной говядины импортного производства выделены кормовые антибиотики гризин и бацитрацин.

В куриных яйцах и яичном порошке выявили тетрациклин и стрептомицин (табл.).

Наиболее широкий спектр антибиотиков в остаточных количествах был обнаружен в образцах молока и молочных продуктах – пенициллин, тетрациклин, стрептомицин и левомицетин.

При анализе результатов исследования образцов животноводческой продукции выяснилось, что чаще в пробах выявляли антибиотики тетрациклинового ряда – в 66,5% случаев. Стрептомицин присутствовал в 21,9% образцов говядины, субпродуктов, молока и молочных продуктов. Левомицетин встречался чаще в молоке и молочных продуктах – 3,2% случаев. Пенициллин обнаруживался только в молочных продуктах в 5,4% случаев. Крайне редко обнаруживались гризин и бацитрацин – в 0,3 и 0,1% случаев.

Высокий процент обнаружения тетрациклина объясняется тем, что этот антибиотик постоянно добавляют в корма для стимуляции роста.

В яйцах куриных обнаружены тетрациклин и стрептомицин, несмотря на запрет добавления антибиотиков в корма курам-несушкам.

Молочные продукты содержали практически все антибиотики, добавляемые в корма.

Выводы. На сегодняшний день производители сельскохозяйственной продукции не готовы отказаться от применения антибиотиков, так как это может привести к вспышкам инфекций, передающихся потребителям через заражённую продукцию животноводства и птицеводства [6].

Прежде всего необходимо разработать препараты, составляющие альтернативу антибиотикам. Наиболее перспективными из всех направлений являются разработки соединений, представляющих смеси органических кислот, так называемые кормовые подкислители с антибактериальным эффектом в отношении различных видов шигелл, сальмонелл, патогенных сероваров кишечной палочки. Эти соединения, проникая внутрь бактериальных клеток, нарушают кислотно-щелочной баланс, приводя к гибели патогенных бактерий, но никак не влияя на нормальную микрофлору желудочно-кишечного тракта [7].

Литература

1. Навашин С.М. Рациональная антибиотикотерапия. М.: Медицина, 1982. 496 с.
2. Светоч Э.А. Множественная лекарственная устойчивость бактерий и пути рационального применения антибиотиков в ветеринарной практике // Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. 1975. № 4. С. 74–77.
3. Егоров Н.С. Антибиотики в животноводстве. Основы учения об антибиотиках. М., 1979. С. 423–424.
4. Туник А.Н. Уровень обнаружения антибиотиков в продуктах животноводства и растениеводства // Ветеринария, 2007. № 10. С. 48–52.
5. Сидоренко С.В. Резистентность микроорганизмов и антибактериальная терапия. Антибактериальные препараты // Русский мед. журн. 1998. Т. 6. № 11. С. 717–725.
6. Вечеркин А.С. Нерациональное использования антибиотиков в животноводстве // Ветеринария. 2004. № 9. С. 7–9.
7. Кузнецова Т.С. Кормовые антибиотики, пробиотики, подкислители и их комплексы с ферментами при производстве яиц // Ветеринария: 2007. № 2. С. 51–53.