

- государственная академия ветеринарной медицины, РО «Белптицепром»; сост.: Б.Я. Бирман [и др.]. – Минск, 2006. – 18 с.
5. Содержание, кормление и уход за животными: справочник / В. А. Медведский. – Минск: Техноперспектива, 2007. – 659 с.
6. Юхневич, Г. Г. Микроорганизмы в биоиндикации и биотестировании: лаб. практикум/ Г. Г. Юхневич, И. М. Колесник. – Гродно: ГрГУ, 2012. – 51 с.
7. Аэрозольное оборудование ИГЕБА [<http://igeba.ru/>].
- УДК [57.083.138.4+543.645.9]:637.07

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОВОДСТВА

П. Г. Лукьянчик, И. Н. Кузнецов

УО «Белорусский государственный технологический университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 11.06.2015 г.)

Аннотация. Выявлено, что в настоящее время существует проблема чрезмерного поступления в организм человека антибиотиков с пищевыми продуктами животного происхождения, это связано с недостаточным контролем за их содержанием на всех стадиях производства, что в конечном итоге негативно сказывается на здоровье. Показано, что для определения антибиотиков в животных кормах, биологических жидкостях и пищевых продуктах животного происхождения на сегодняшний день используются такие методы анализа, как микробиологический, химический с фотометрической детекцией, иммунохимический, люминесцентный, электрохимический и хроматографический. Установлено, что наиболее подходящими для определения антибиотиков являются методы иммунохимического, люминесцентного и хроматографического анализа, которые тем не менее являются относительно дорогостоящими. Поэтому наиболее доступным и распространенным на данный момент является микробиологический анализ.

Summary. It is revealed that at present time there is a problem of excessive intake of human antibiotics with food products of animal origin, which is associated with insufficient control over their content at all stages of production and, ultimately, it negatively affects health. It is shown that for the determination of antibiotics in animal feed, biological fluids and foods of animal origin currently used such methods as microbiological, chemical with photometric detection, immunochemical, fluorescent, electrochemical and chromatographic analysis. It is established that the most suitable for the determination of antibiotics are immunochemical methods, fluorescent and chromatographic analysis, which, however, are relatively expensive. Therefore, the most available and common at the moment is the microbiological analysis.

Введение. В настоящее время открыты и описаны тысячи антибиотических веществ, но активно используется лишь около 150 из них [1]. Мировое производство антибиотиков достигает десятков тысяч тонн, при этом половина расходуется на нужды сельского хозяйства, в

основном животноводства [2]. По данным исследований установлено, что уверенно лидируют в потреблении антибиотиков такие отрасли животноводства, как свиноводство и птицеводство [3].

Использование антибиотиков в животноводстве преследует следующие основные цели: для лечения, в качестве стимуляторов роста, как противопаразитарные и профилактические средства.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует снизить потребление антибиотиков в животноводческом производстве. По этому поводу ВОЗ называет несколько основных причин [4]. Во-первых, применение антибиотиков обуславливает появление у животных устойчивых (резистентных) форм микроорганизмов, которые не подвергаются воздействию данного антибиотика. Во-вторых, в сельском хозяйстве запрещено применение антибиотиков, которые используются в медицине для лечения человека. В третьих, при поступлении антибиотиков вместе с продукцией животноводства в организм человека происходит общее снижение иммунитета, возрастает фильтрующая нагрузка на печень и почки, возможно появление аллергии. В 2006 г. в странах Европейского союза из-за увеличивающихся случаев появления перекрестной антибиотикорезистентности у людей было принято решение о запрете использования кормовых антибиотиков для стимуляции роста животных [5]. Несмотря на это, многие страны, даже такие экономические гиганты, как США и Россия, подобного запрета не ввели. Не учитывая возникающие периодически споры о вреде кормовых антибиотиков, из-за отсутствия запрета белорусские производители также продолжают активно пользоваться подобными стимуляторами роста. Однако отсутствие запрета не позволяет использовать антибиотики бесконтрольно. Существуют определенные нормы и правила, которые регулируют количество антибиотиков, поступающих к нам с продуктами питания (например, санитарные правила и нормы).

Таким образом, для контроля за поступлением антибиотиков в животные корма, а также в пищевые продукты должны быть использованы достоверные, точные, доступные и экспрессные методы обнаружения антибиотиков, рассчитанные на огромные масштабы производства.

Цель работы: систематизировать и охарактеризовать современные методы определения антибиотиков в животных кормах, биологических жидкостях животных и пищевой продукции животного происхождения, которые могут быть применены для контроля содержания антибиотиков на каждой стадии производства целевого продукта.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате анализа литературных источников выявлено 6 основных методов опреде-

ления антибиотиков в животных кормах, биологических жидкостях животных и пищевой продукции животноводства:

- микробиологический метод;
- метод химического анализа с фотометрической детекцией;
- метод иммунохимического анализа;
- люминесцентные методы;
- электрохимические методы;
- хроматографические методы.

Так, микробиологический метод определения антибиотиков основан на способности антибиотиков диффундировать в агаровую среду, содержащую споры тест-культуры и препятствовать их росту, что приводит к образованию прозрачных (или окрашенных при добавлении соответствующих веществ) зон ингибирования. Наличие антибиотика устанавливается по размеру диаметра этой зоны. Данный метод нашел наибольшее применение в молочной промышленности.

Микробиологический метод определения [6] предложен для обнаружения в составе сырого, пастеризованного, стерилизованного и предварительно восстановленного сухого коровьего молока таких антибиотиков, как неомицин, стрептомицин, хлорамфеникол и др. При этом применяется тест-культура бактерий *Bacillus stearothermophilus* без индикатора или с индикатором бромкрезолпурпур и бриллиантовым черным. Минимальная определяемая концентрация (амоксциллин и ампициллин) составляет 0,002 мкг/г.

Микробиологический метод обладает относительно высокой чувствительностью, но при этом довольно низкой избирательностью и большой продолжительностью (термостатирование может длиться до 24 ч). Однако на сегодняшний день он получил наибольшее распространение.

Методы химического анализа с фотометрической детекцией отличаются низкой избирательностью и точностью и не находят в настоящее время должного применения в животноводческом производстве.

Иммунохимический анализ относят к методам связывания – группе родственных методов, отличительной особенностью которых является возможность определять количество анализируемого вещества по количеству комплекса, образовавшегося при взаимодействии этого вещества со связывающим агентом и последующим измерением его распределения между «свободной» и «связанной» фазами. Для последующего определения распределения лиганда между свободной и связанной фазами вводится «метка». Меткой может служить радиоактивный изотоп, фермент, флуоресцирующее соединение и др. В основу любого иммунохимического метода положена реакция взаимодей-

ствия между антигеном и антителом с образованием комплекса антиген-антитело [7].

Одним из наиболее часто применяемых разновидностей иммунохимического метода анализа является иммуноферментный анализ (ИФА), в большинстве случаев основу которого составляют микропланшетные твердофазные иммуноферментные аналитические системы, в которых образующиеся иммунные комплексы выявляются на основании измерения каталитической активности фермента, соединенного с одним из взаимодействующих иммунореагентов. Так открыт метод определения с помощью ферментных систем β -лактамных антибиотиков в молоке, тканях и биологических жидкостях животных (например предел обнаружения ампициллина составляет 2 нг/мл) [8]. В БелГИМ аттестован метод ИФА определения антибиотиков в таких пищевых продуктах, как молоко, сухое молоко, мясо, мед, сыр, масло сливочное, яйца и др. С помощью этого метода определяют такие антибиотики, как хлорамфеникол, тетрациклин, пенициллин, стрептомицин с использованием набора реагентов MaxSignal® производства BIOO Scientific Corporation (США). Предел обнаружения для мяса, печени, почек и яиц составляет 0,25 мкг/кг, для молока и молочных продуктов – 0,5 мкг/кг [9].

Однако ИФА в силу диффузионных ограничений характеризуется продолжительностью от одного до нескольких часов и, кроме того, предполагает использование специального оборудования для решения двух задач: отделения прореагировавших молекул от непрореагировавших и фотометрической регистрации активности, связавшейся с носителем ферментной метки.

Этого недостатка ИФА лишена другая разновидность метода иммунохимического анализа, применяемого для обнаружения антибиотиков в животных кормах и пищевых продуктах – иммунохроматографический анализ. Метод иммунохроматографического анализа основан на принципе тонкослойной хроматографии. Для осуществления данного метода анализа используются специальные тест-полоски или тест-панели.

С помощью метода иммунохроматографического анализа в молоке и молочных продуктах определяют такие антибиотики, как хлорамфеникол (предел обнаружения 10 нг/мл), стрептомицин (предел обнаружения 500 нг/мл) и ампициллин (предел обнаружения 10 нг/мл) [10]. В данном случае используют мультимембранный композит, в определенных зонах которого нанесены частицы окрашенного маркера (частицы коллоидного золота) в комплексе с антителами. При контакте мультимембранного композита с образцом, содержащим антибиотик, происходит образование комплекса антиген-антитело-антиген-антитело-антиген-антитело, что приводит к изменению оптической плотности окрашенного маркера в определенных зонах мембраны. При этом происходит изменение оптической плотности окрашенного маркера в определенных зонах мембраны, что приводит к изменению оптической плотности окрашенного маркера в определенных зонах мембраны.

мембранного композита с тестируемой пробой в определенной зоне (зонах) мультимембранного композита образуются окрашенные полосы.

К преимуществам иммунохимического анализа относят: высокую чувствительность, позволяющую выявлять концентрации до 0,05 нг/мл; стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения анализа (год и более); возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала; быстрота и удобство проведения анализа; возможность автоматизации процесса. Однако на разработку необходимых системы для определения конкретных антибиотиков необходима затрата значительных средств.

Люминесцентный анализ – совокупность методов анализа, основанных на явлении люминесценции, которое заключается в нетепловом свечении вещества, происходящим после поглощения им энергии возбуждения. При этом происходит излучательный переход электронов атомов или молекул из возбуждённого состояния в основное. Причиной первоначального их возбуждения могут служить различные факторы: внешнее излучение, температура, химические реакции и др. Что касается антибиотиков, то для их определения в кормах, биологических жидкостях животных и пищевых продуктах чаще всего применяют такой вид люминесцентного метода анализа, как фотолюминесцентный (главным образом флуоресцентный) анализ, в котором причиной возбуждения частиц вещества является свет (ультрафиолетовой, видимой или инфракрасной областей спектра).

Определению антибиотиков в пищевых продуктах посвящено большое число исследований, основанных на использовании сенсibilизированной люминесценции ионов Eu(III) и Tb(III) . Эти работы относятся к антибиотикам тетрациклинового и хинолинового ряда, которые наиболее широко применяются в животноводстве. Так, например, проводят определение тетрациклина в курином мясе непосредственно в фазе сорбента по люминесценции его комплекса с ионом Eu(III) , в присутствии цитрат-ионов и катионного ПАВ – цетилтриметиламмоний хлорида (ЦТА). Для определения норфлоксацина и ципрофлоксацина после предварительного экстракционного выделения предложена твердофазная люминесценция ионов Tb(III) , которые использованы в качестве проявляющих на пластинках для ТСХ. В проявляющий раствор входит также тетрадецилсульфат натрия и триоктилфосфиноксид [11].

Другим примером является экстракционно-флуориметрическая методика косвенного определения пятнадцати аминогликозидных антибиотиков в биологических жидкостях (кровь, молоко, моча), основанная на образовании трехкомпонентных комплексов антибиотиков с паразеодимом и флуоресцеиновым комплексом в водном растворе

при рН 5,8–6,2, экстракции этих нефлуоресцирующих комплексов смесью (1:1) изоамилового спирта с бензолом, реэкстракции флуоресцеинового комплексона раствором фторида натрия и измерении интенсивности свечения красителя. Предел обнаружения от 0,01 до 10 нг/г антибиотиков [11].

При определении антибиотиков люминесцентными методами анализа можно отметить очень высокую избирательность, чувствительность (определение нг/г вещества) и быстроту проведения анализа. Кроме того, люминесцентный анализ является относительно недорогим методом, однако он требует применения вспомогательных веществ с высокой степенью чистоты, что предусматривает тщательную работу специалиста-аналитика.

Электрохимический анализ включает группу методов химического анализа, основанного на явлении электролиза. Для определения антибиотиков в исследуемых объектах применяют такие разновидности электрохимического анализа, как амперометрическое титрование, ионометрия, вольтамперометрия, капиллярный электрофорез.

Разработаны методики электрохимического определения антибиотиков тетрациклинового ряда (окситетрациклина, метациклина и тетрациклина) в молоке с использованием амперометрического титрования и ионометрии. Метод дифференциальной импульсной вольтамперометрии использован для одновременного определения окситетрациклина, тетрациклина и хлортетрациклина. В качестве стационарного применяется ртутный электрод. Методика позволяет определять содержание перечисленных антибиотиков в кормах для животных в интервале концентраций 0,02–0,18 мг/мл [11].

Также разработаны системы капиллярного электрофореза для определения таких антибиотиков, как амоксициллин, гентамицин, тетрациклин, тилозин и др. в готовых лекарственных средствах ветеринарного назначения. Нижняя граница диапазона измерений массовой концентрации антибиотиков составляет 1 г/л [12].

Преимуществами методов электрохимического анализа являются экспрессность, низкий расход реактивов и низкая стоимость единичного анализа. Недостатками данных методов являются недостаточно высокая чувствительность и избирательность анализа.

В настоящее время для определения антибиотиков в животных кормах, биологических жидкостях животных и продуктах хроматографические методы применяются довольно широко. Среди разновидностей больше всего используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентным, УФ- и масс-спектрометрическими детекторами. Метод ВЭЖХ основан на принципе жидкостной

хроматографии, т. е. разделении компонентов смеси, который заключается в различии равновесного распределения их между двумя не смешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна. ВЭЖХ от обычной жидкостной хроматографии отличается использованием высокого давления и мелкозернистых сорбентов, что позволяет разделить сложные смеси веществ быстро и полно.

К примеру, в продуктах животного происхождения методом ВЭЖХ определяют антибиотики тетрациклиновой группы (окситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклин, доксициклин). Диапазон измеряемых массовых долей окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина при массе анализируемой навески пробы 10 г составляет 0,01-5 мг/кг, а доксициклина – 0,02-10 мг/кг [12].

Метод ВЭЖХ отличается высокой избирательностью, чувствительностью, точностью и надежностью. Но для его реализации необходимо дорогостоящее оборудование и иногда длительное время. В некоторых случаях этих недостатков помогает избежать метод тонкослойной хроматографии, который основан на разделении веществ с помощью сорбента, нанесенного на подложку. Примером может служить определение антибиотиков оксихинолинового ряда в кормах для животных, где в качестве сорбента используется силикагель. С помощью люминесцентных меток определяются такие антибиотики, как норфлоксацин и пefлоксацин, предел обнаружения которых 1 мкг/г и 5 мкг/г соответственно [13].

Заключение. Таким образом, в настоящее время для определения антибиотиков в животных кормах, биологических жидкостях, животных и пищевых продуктах животного происхождения разработаны и частично внедрены такие эффективные методы анализа, как иммунохроматографический и люминесцентный метод, а также метод ВЭЖХ. Данные методы позволяют с необходимой быстротой, точностью и чувствительностью определять большинство применяющихся в животноводческом производстве антибиотиков, что позволит не допустить попадания их потребителю в количествах, способных влиять на здоровье человека. Несмотря на перечисленные преимущества, эти методы имеют существенные ограничения для внедрения в качестве средств массового анализа. Для их реализации необходимо дорогостоящее оборудование и квалифицированный персонал. К тому же в этих методах чаще всего предполагается проведение специальной пробоподготовки. Поэтому на данном этапе наибольшее распространение имеют микробиологические методы, которые являются более простыми и высоко чувствительными, но довольно продолжительными и мало избирательными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутова, С. Н. Теоретические основы биотехнологии. Биохимические основы синтеза биологически активных веществ / С. Н. Бутова, И. А. Типисева, Г. И. Эль-Регистан; под ред. И. М. Грачевой. – М.: Элевар, 2003. – 554 с.
2. Басова, Е. Война миров: антибиотики в сельском хозяйстве / Е. Басова // Информационное агентство DairyNews (ООО «Новости молочного рынка») [Электронный ресурс]. – Москва, 2012. – Режим доступа: <http://www.dairynews.ru/dairyfarm/voyna-mirov-antibiotiki-v-selskom-khozyaystve.html>. – Дата доступа: 10.05.2015.
3. Антибиотики как обязательное принудительное «блюдо российского стола». Конкурс «живые слова» [Электронный ресурс] / ООО «Паркмедиа». – М.: электронное издание «Наука и технологии России», 2009. – Режим доступа: http://www.stfr.ru/material.aspx?CatalogId=222&d_no=23788#.VYeWqRYINB8. – Дата доступа: 12.05.2015.
4. Устойчивость к антибиотикам – серьезная угроза общественному здравоохранению [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 2014. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/ru/>. – Дата доступа: 12.05.2015.
5. Куликов, Н. В. Успешный Европейский опыт отказа от кормовых антибиотиков в птицеводстве / Н. В. Куликов // Московский ветеринарный WEB-центр [Электронный ресурс]. – Москва, 2009. – Режим доступа: <http://webmvc.com/show/article/show.php?id=124>. – Дата доступа: 13.05.2015.
6. Молоко и молочные продукты – серьезные угрозы. Микробиологические методы определения наличия антибиотиков: ГОСТ 31502-2012. – Введ. 27.12.2013. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2013. – 20 с.
7. Пивень, Н. В. Методы иммунохимического анализа с использованием меченых реагентов / Н. В. Пивень, А.И. Бураковский // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – Витебск, 2012. – № 1:93-102. – С. 93-102.
8. Fitzgerald, SP. Stable competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit for rapid measurement of 11 active beta-lactams in milk, tissue, urine, and serum / SP Fitzgerald [and oth.] // National Center for Biotechnology Information. USA National Library of Medicine [Electronic resource]. – Rockville Pike, 2007. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17373465>. – Date of access: 14.05.2015.
9. Тест на антибиотики методом ИФА [Электронный ресурс] / ООО «ЛонгТрейд». – Минск, 2015. – Режим доступа: <http://longtrade.by/production/testi-na-antibiotiki-metodom-ifa.html>. – Дата доступа: 15.05.2015.
10. Способ иммунохроматографического определения антибиотиков в молоке и молочных продуктах: пат. № 2406090 Российской Федерации, МПК G 01 N 33/50, A 23 C 9/158 / Б.Б. Дзантиев [и др.]; заявитель учреждение Российской академии наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, общество с ограниченной ответственностью «Фармаблок», открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения». – № 2009105439/10; заявл. 18.02.09; опубл. 10.12.10 // Офиц. бюлл. / Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Российской Федерации. – 2010. – № 34. – 13 с.
11. Бельтюкова, С. В. Методы определения антибиотиков в пищевых продуктах / С. В. Бельтюкова, Е. О. Ливенцова // Методы и объекты химического анализа. – Киев, 2013. – № 1. – С. 4-13.
12. Комарова, Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» / Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев. – Санкт-Петербург, 2006. – 212 с.
13. Бельтюкова, С. В. Определение антибиотиков оксихинолинового ряда в кормах для животных с использованием метода тонкослойной хроматографии / С. В. Бельтюкова,

Ливенцова Е. О., Малинка Е. В. // Publishing house Education and Science s.r.o. [Электронный ресурс]. – Прага, 2006. – Режим доступа: http://www.rusnauka.com/NTIP_2006/Chimia/4_bel_tjukova%20s.v..doc.htm. – Дата доступа: 20.05.2015.

УДК 619:616.9 (476)

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ОСОБО ОПАСНЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

В. В. Максимович, Д. Д. Морозов

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 22.06.2015 г.)

Аннотация. В статье дан анализ эпизоотической ситуации по инфекционным болезням животных в мире и в Республике Беларусь, определена стратегия профилактики и ликвидации указанных болезней в нашем государстве.

Summary. In the article the epizootological situation analysis on infectious diseases in the world and the Republic of Belarus has been presented; the prevention and eradication strategy to the mentioned diseases in our country has been defined.

Введение. Инфекционные болезни имеют убиквиторное распространение и представляют собой социально-экономическую проблему для многих государств мира. В настоящее время в мире зарегистрировано около 500 заразных болезней животных, 200 из которых относятся к зооантропонозам или антропозоонозам. В Республике Беларусь диагностируется около 100 инфекционных болезней, из них около 20 являются общими для животных и человека. Количество инфекционных болезней постоянно увеличивается. Так, например, только за последние 30 лет диагностировано около 20 новых инфекционных болезней (губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, цирковиральная инфекция, репродуктивно-респираторный синдром и эпидемическая диарея свиней, высокопатогенный грипп птиц, болезнь, вызванная вирусом Шмалленберг и др.).

Особое место в заразной патологии животных занимают новые и возвращающиеся особо опасные болезни, возникновение которых приводит к огромным экономическим потерям, а многие из них представляют опасность для здоровья человека. Важным негативным последствием возникновения особо опасных заразных болезней животных является также запрет на экспорт животноводческой продукции,