

чувствительных объектов (культуры клонок, куриные эмбрионы, восприимчивые животные) или ЦПД<sub>50</sub> (CD<sub>50</sub>) - 50% цитопатогенная доза - минимальное количество микробных клеток или вирусосодержащего материала, вызывающее цитопатогенное действие в половине взятых в опыт пробирок с культурой ткани.

Мы в своих исследованиях учитывали, однако, особенности клинического проявления анаплазмоза и, главное, процентное соотношение между числом заболевших и павших животных, т.е. процент летальности.

По нашим, и ряду других авторов, данным, летальность при анаплазмозе рогатого скота находится в пределах 10-30% и более, но она растянута во времени и часто очень длительном. Поэтому ориентиром для нас при выведении минимальной заражающей дозы возбудителя служило abortивное течение болезни, т.е. кратковременное проявление болезни в легкой форме без проявления некоторых (нередко основных симптомов): при анаплазмозе - отсутствие глубокой анемии - основного и ведущего признака болезни.

Минимальная заражающая доза возбудителя, при которой мы отмечали заболевание животных с проявлением полного симптомокомплекса, присущего анаплазмозу, - выраженной паразитемией, глубокой анемией, с последующим исхуданием заболевшего животного составила:

- а) для овец -  $2,5 \times 10^4$  A. ovis/животное,
- б) для крс -  $1,5 \times 10^5$  A. marginale/животное.

Последующее двукратное снижение дозы возбудителей от указанных выше (п.п. а., б.) приводило, как правило, к abortивному течению анаплазмоза:

- а)  $1,25 \times 10^4$  A. ovis/животное,
- б)  $0,75 \times 10^5$  A. marginale/животное.

Поэтому в последующей работе при оценке иммуногенных свойств вакцины применяли, как правило, дозы возбудителей, соответствующие, по нашим данным, трем минимальным заражающим:

- а) для овец -  $7,5 \times 10^4$  A. ovis /животное
- б) для кр.рог.скота -  $4,5 \times 10^5$  A. marginale/животное

Последовательность расчета заражающей дозы -  $7,5 \times 10^4$  A. ovis /животное при оценке иммуногенных свойств вакцины против анаплазмоза овец.

Пример: количество эритроцитов в  $1 \text{ мм}^3$  - 6 786 000;

Количество эритроцитов в 100 п.з. микроскопа -  $300 \times 100 = 30\,000$ ;

Количество анаплазм в 100 п.з. микроскопа - 3;

Определим количество анаплазм в  $1 \text{ мм}^3$ , составив пропорцию:

$$30\,000 - 3 \quad X = 6\,786\,000 \times 3 / 30\,000 = 678,6;$$

$$6\,786\,000 - x$$

Количество анаплазм в  $1 \text{ см}^3$  (мл) крови -  $678,6 \times 1000 = 678,600$ .

Доза крови для заражения животных (опытных и контрольных):

$75000 : 678,600 = 0,12 \text{ см}^3$  (мл) инфицированной крови.

Вакцины из антигенов соответственно: A. ovis - для овец, A. marginale - для крупного рогатого скота вводили двукратно, с интервалами - 30 и 45 дней (в зависимости от применяемого адьюванта).

Напряженный иммунитет в 85% случаев формировался, в основном, к 60 дню после ревакцинации, предохранявший животных от заболевания как при контрольном введении инвазированной крови с возбудителями в указанных дозах, так и при нападении инвазированных клещей на животных при их пастбищном содержании.

УДК: 619:614.9-07

**О.И. Кальницкая**

*Московский государственный университет прикладной биотехнологии*

## **ПОДБОР МИКРОБНЫХ ТЕСТ-КУЛЬТУР К АНТИБИОТИКАМ**

Согласно СанПиН 2.3.2.1078-01, для продовольственного сырья животного происхождения обязательна информация об использовании (или отсутствии такового) пестицидов (гексахлорциклогексана, ДДТ и его метаболитов), антибиотиков, как до-

пущенных к применению в сельском хозяйстве (гризин, бацитрацин), так и лечебных, наиболее часто используемых в ветеринарии (тетрациклиновая группа, левомицетин, пенициллин, стрептомицин).

Все перечисленные вещества использу-

ются во всем мире, в том числе и у нас, для коррекции (исправления) различных негативных факторов, присутствующих при выращивании животных и их переработке. Однако остаточные количества антибиотиков недопустимы в сырье и продуктах животного происхождения.

Чтобы принять обоснованное решение, ветеринарному врачу необходимы глубокие знания фармакокинетики антибиотиков в организме животных различных видов, а также методики выявления их остаточных количеств в мясе, молоке и других продуктах и способы их обезвреживания с целью предотвращения вредного действия на организм людей.

В настоящее время наиболее доступными диагностическими методами обнаружения антибиотиков являются микробиологические. Мы поставили перед собой задачу подобрать к антибиотикам, содержание которых в продуктах убоя нормируется СанПиН 2.3.2.1078-01 и рекомендациями ФАО ВОЗ, наиболее чувствительные тест-культуры.

**Материалы и методы.** Постановка теста на чувствительность проводилась с чистой культурой методом диффузии в агар и методом серийных разведений.

Для исследования были использованы эталонные штаммы микроорганизмов, полученные в ФГУ «ВГНКИ». Подбор микроорганизмов осуществлялся согласно литературных данных (1). Чувствительность определяли по отношению к следующим антибиотикам: бензилпенициллину, тетрациклину, неомицину, гентамицину, спектиномицину, левомицетину, линкомицину, гризину и бацитрацину.

Чашки с дисками инкубировали в течение 18 часов при температуре 35–37° С в перевернутом положении, чтобы предотвратить размывание газона конденсационной жидкостью.

Показателем чувствительности микроорганизма к антибиотику служил размер зоны задержки микробного роста вокруг бумажного диска.

Из всех исследуемых штаммов были отобраны те, у которых наблюдалась наибольшая зона задержки роста вокруг диска, пропитанного антибиотиком. К таковым относятся: *B.subtilis* L2, *B.mycoides* 537, *V.pumilus* NCTC 8241, *S.aureus* 209-P и ATCC 6538, *M.luteus* ATCC 9341, *Str.thermophilus* и *Str.faecium*.

Следующим этапом нашей работы было тестирование степени чувствительности отобранных штаммов к изучаемым ан-

тибиотикам. Степень чувствительности микроорганизмов определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде. В качестве питательной среды использовали бульон на переваре Хоттингера, содержащий 110 мг% аминного азота, с добавлением 1% глюкозы, рН 7,2.

Степень чувствительности определяли по минимальному количеству антибиотика, дающему полную видимую задержку роста культуры (прозрачный бульон).

**Результаты исследования.** Нами установлено, что к бензилпенициллину чувствительны стафилококки, микрококки, термофильный стрептококк. Эти микроорганизмы не способны развиваться при концентрации антибиотика в среде 0,001 ед/мл. *B.subtilis* L2 перестает размножаться при концентрации бензилпеницилина 0,01 ед в 1 мл среды. Менее чувствительны *B.mycoides* 537, *V.pumilus* NCTC 8241 и *Str.faecium*. Их чувствительность составила 0,1 и 0,5 ед/мл соответственно.

К тетрациклину высокочувствителен штамм *B.subtilis* L2. Он прекращает регенерировать при концентрации тетрациклина в среде 0,01 мкг/мл. *V.pumilus* NCTC 8241, *S.aureus* 209-P и *M.luteus* ATCC 9341 чувствительны к концентрации 0,1 мкг тетрациклина в мл среды. У остальных микроорганизмов чувствительность ниже.

*B.subtilis* L2 и *B.mycoides* 537 чувствительны только к 0,1 мкг антибиотика в мл среды. *V.pumilus* NCTC 8241 и *S.aureus* 209-P имеют еще более низкую чувствительность, они прекращают размножаться при концентрации 0,5 мкг неомицина в мл среды. Остальные микроорганизмы не размножаются при концентрации 1 мкг/мл и выше. Однако, поскольку допустимое содержание неомицина, согласно рекомендаций ФАО ВОЗ, составляет от 0,5 мг/кг в мясе до 20 мг/кг в субпродуктах, то можно считать, что все исследуемые культуры микробов чувствительны к этой концентрации.

Чувствительными к гентамицину можно считать штаммы *B.subtilis* L2 и *V.pumilus* NCTC 8241. Они прекращают размножение при концентрации антибиотика в растворе 0,01 мкг/мл. Умеренной чувствительностью также обладают штаммы *B.mycoides* 537 и *M.luteus* ATCC 9341, прекращающие размножение при концентрации 0,5 мкг/мл гентамицина. Остальные культуры можно отнести к малочувствительным.

Предельно допустимый уровень спектиномицина в продуктах убоя (согласно рекомендаций ФАО-ВОЗ) - 0,5 мг/кг. Та-

Нижний предел чувствительности микробных культур к антибиотикам

Антибиотик	Концентрация антибиотика в питательной среде, ед/мл, мкг/мл							
	<i>B.subtilis</i> L2	<i>B. micoi-</i> <i>des</i> 537	<i>B.pumilus</i> NCTC8241	<i>S.aureus</i> 209-P	<i>S.aureus</i> ATCC6538	<i>M.luteus</i> ATCC9341	<i>Str.ther-</i> <i>mophilus</i>	<i>Str.fae-</i> <i>cium</i>
Пенициллин (не допуск)*	0,01	1	0,5	0,001	0,001	100	0,001	1
Тетрациклин (не допуск)	0,01	5	0,1	0,1	0,5	0,1	5	100
Неомицин (0,5 мг/кг)	0,1	0,1	0,5	0,5	1	1	100	5
Гентамицин (0,1мг/кг)	0,01	1	0,01	5	5	0,5	1	100
Спектиномицин (0,5 мг/кг)	0,01	1	0,001	0,1	0,5	1	5	10
Левомецетин (не допуск)	0,1	0,1	0,1	10	10	0,001	0,001	0,01
Линкомицин (0,1мг/кг)	0,1	5	100	10	100	1	100	100
Гризин (не допуск)	0,1	1	0,5	10	10	100	10	100
Бацитрацин (не допуск)	0,5	1	0,5	5	10	0,01	100	100

\* В скобках указаны максимальные уровни остатков антибиотиков, допускаемые в продуктах убоя согласно СанПиН 2.3.2.1078 – 01 и рекомендаций ФАО ВОЗ.

кой чувствительностью обладают штаммы *B.subtilis* L2, *B.mycoides* 537, *B.pumilus* NCTC 8241, *S.aureus* штаммы 209-P и ATCC 6538. У остальных микроорганизмов чувствительность лежит за пределами требуемой.

Левомецетин – синтетический аналог хлорамфеникола – в продуктах убоя не допускается. Высокой чувствительностью к этому антибиотику обладают *M.luteus* ATCC 9341 и *Str.thermophilus*. Они чувствительны к содержанию в растворе 0,001 мкг/мл левомецетина. При концентрации 0,01мкг/мл не растет также *S.faecium*.

При содержании в растворе от 0,001 до 5 мкг/мл линкомицина способны размножаться практически все исследуемые культуры, за исключением *M.luteus* ATCC 9341 (он чувствителен к концентрации 0,1 мкг/мл) и *B.subtilis* L2 (предел чувствительности 1 мкг/мл).

*B.subtilis* L2 и *B.pumilus* NCTC 8241 чувствительны к концентрации гризина в растворе 0,5 мкг/мл.

*M.luteus* ATCC 9341 прекращает размножение при содержании в растворе 0,01

мкг/мл бацитрацина. Остальные апробированные культуры можно считать недостаточно чувствительными к бацитрацину.

В результате исследований были установлены пределы чувствительности восьми штаммов микроорганизмов к девяти антибиотическим препаратам, наиболее часто применяемым в ветеринарии и животноводстве. Пределы чувствительности изучаемых микробных культур представлены в таблице.

#### Заключение

Штамм *B.subtilis* L2 является одновременно чувствительным к наличию в среде бензилпенициллина, тетрациклина, неомицина, гентамицина, спектиномицина, линкомицина и гризина, охватывая, таким образом, достаточно широкий спектр антибиотиков. Для определения наличия в субстрате левомецетина и бацитрацина может быть использован штамм *M.luteus* ATCC 9341, как наиболее чувствительный. У остальных изучаемых микроорганизмов интервал антибиотикочувствительности уже или же степень чувствительности ниже требуемой.

#### РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты изучения чувствительности восьми штаммов микроорганизмов к антибиотикам, применяемым в ветеринарии и животноводстве.

#### SUMMARY

This article is about the microorganism's sensation to the main veterinarian antibiotics. *B.subtilis* L2 and *M.luteus* ATCC 9341 may be used for the identification of the antibiotics in meat.

## Литература

1. Аксенов В.И., Ковалев В.Ф. Антибиотики в продуктах животноводства. М.: Колос, 1977. 160 с.
2. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078-01. М., 2002. 164 с.

УДК 619:614.9-07

**О.И. Кальницкая***Московский государственный университет прикладной биотехнологии*

## **ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ МЯСА НА УМЕНЬШЕНИЕ В НЕМ ОСТАТКОВ АНТИБИОТИКОВ**

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

Лабораториям для практической работы на сегодняшний день требуются легко доступные экспресс-методы с высокой чувствительностью и удовлетворительными метрологическими характеристиками, которые позволили бы обнаруживать остаточные количества антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения.

Разработка и применение различных современных методов анализа антибиотиков гарантируют выпуск продуктов, свободных от присутствия лекарственных препаратов и отвечающих требованиям стандартов по качеству и безопасности [1,2,3].

В задачи ветеринарных специалистов входит ветеринарно-санитарный контроль продукции животноводства при обнаружении остаточных количеств антибиотиков, а также разработка способов технологической обработки продуктов убоя для уменьшения содержания в них наиболее часто встречающихся антибиотиков [4].

**Материалы и методы.** Для изучения влияния температурной обработки на разрушение антибиотиков в мышечной ткани нами исследованы 140 образцов мышечной ткани различных видов животных и птицы. Тушки птицы получены из АО «Леггорн» г. Тараклия.

Убой опытных животных и птицы проводили в различные сроки после введения препарата. Отбор образцов тканей проводили по ГОСТ 26668-85. Содержание анти-

биотиков определяли по МУ 3049-84 «Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства», экспресс-методом определения антибиотиков в пищевых продуктах (МУК 4.2.026-95), методом иммуноферментного анализа и высокоэффективной жидкостной хроматографии (МУК 4.1.1912-04).

Для термической обработки применяли режимы и параметры, утвержденные «Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов». Мясо убойных животных проваривали кусками массой не более 2 кг в течение 3 ч. при достижении температуры внутри куска не менее 80°C. Тушки птицы разрубали вдоль позвоночника на две половины и проваривали при 100°C в течение 1 ч.

После проварки образцы повторно исследовали на содержание остаточных количеств антибиотиков. Исследованию также подвергали бульон, полученный после варки.

**Результаты исследований.** «Правила ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов» (1983 г.) не содержат рекомендаций по ветсанэкспертизе продуктов убоя, содержащих остаточные количества антибиотиков. Даны лишь следующие указания: «В случае вынужденного убоя животных, подвергшихся отравлению ядовитыми веществами химического происхождения, решение о возможности использования в пищу мяса от таких животных принимается в каждом отдельном случае, с учетом степени и клинических признаков отравления животных, токсичности и остаточного количества яда, вы-