

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ В ЛІКУВАЛЬНИХ КОРМАХ

В. П. Музика, Т. І. Стецько, О. В. Купецька, О. З. Балян, М. В. Пашиковська

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

Одним із основних показників якості лікувальних кормів є вміст діючої речовини чи речовин. Мікробіологічні методи визначення вмісту антимікробних речовин у хіміотерапевтичних препаратах, а також у лікувальних кормах та преміксах, залишаються одними з найбільш застосовуваних при проведенні контролювання їх якості за показником «вміст діючої речовини». У статті наведені результати апробування методики визначення вмісту амоксициліну в лікувальних кормах мікробіологічним методом дифузії в агар. Отримані результати показали, що межа чутливості мікробіологічного методу для визначення вмісту амоксициліну в лікувальних кормах становить 10 мг/кг комбікорму, а похибка в точності визначення не перевищує 5 %.

У ветеринарній медицині антибіотики застосовуються як для профілактики, так і для лікування інфекційних захворювань тварин. Антибіотики, окрім бактеріостатичної та бактерицидної дії, діючи подібно до анаболітичних стероїдів, можуть стимулювати окремі біохімічні процеси в організмі тварин, що приводить до покращення їх загального стану, прискорення росту та підвищення продуктивності. Так, навіть при неповноцінному раціоні згодовування невеликих доз антибіотиків підвищує біосинтез вітамінів групи В та амінокислот у кишечнику тварин [1]. Поряд із позитивним ефектом використання антибіотиків як стимуляторів росту їх тривале пероральне застосування з кормом у профілактичних та субпрофілактичних дозах приводить до ряду негативних наслідків: зниження імунітету, дисбактеріоз, алергія, токсикоз, розвиток резистентності мікроорганізмів до антибіотиків, накопичення їх залишкових кількостей в продуктах тваринництва, які можуть негативно впливати на здоров'я людини, тощо [2–4]. У 2003 році Законодавчий Комітет ЄС увів заборону на використання антибіотиків — стимуляторів росту з 1 січня 2006 року. На сьогоднішній день, антибіотики як кормові добавки, можуть застосовуватися лише у складі лікувального корму. Згідно директиви Євросоюзу 90/167/ЕЕС процес виробництва лікувальних кормів потребує строгого контролювання на терені всього Європейського співтовариства. Однією з основних цілей контролю лікувальних кормів є визначення вмісту активно діючої речовини чи речовин. Продукція перевіряється як шляхом внутрішнього (під час процесу виготовлення), так зовнішнього контролю якості, який здійснюється ветеринарною інспекцією.

У ветеринарній медицині у складі лікувальних кормів використовуються такі антибіотики, як хлортетрациклін, тіаулін, тилозин, доксициклін, колістин, авіламіцин, лінкоміцин, а також йонофорні кокцидіостатичні антибіотики (саліноміцин, монензин, наразин, семдураміцин, мадураміцин). Амоксицилін теж широко використовують у лікувальних кормах для лікування інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці. Амоксицилін відноситься до бета-лактамних антибіотиків, який інгібує біосинтез стінки бактеріальної клітини. Він ефективно діє як проти грам-позитивних, так і грам-негативних мікроорганізмів. Так, останнім часом в Україні були зареєстровані препарати амоксициліну, такі як: ремокс, виробництва фірми ІНВЕСА (Іспанія), мікроамокс, виробництва фірми Індустрія Італіяна Інтеграторі ТРЕІ С.п.А. (Італія), амоксицилін 70 %, виробництва фірми КЕЛА Н,В, (Бельгія), амоксикрид 60 %, виробництва фірми СЦ Кріда Фарм (Румунія), які є випускаються у формі порошків для орального застосування і задаються з комбікормом в якості лікувального корму. Зазвичай амоксицилін додається до лікувального корму з розрахунку від 250 до 500 мг на кг комбікорму.

Для визначення амоксициліну в лікувальних кормах, мікробіологічний метод відіграє важливу роль, так як є простим у виконанні, дешевим і таким, що не потребує для проведення контролювання використання дорогих приладів та тест-систем. До того ж, лабораторії для скринінгу присутності антимікробних препаратів у продукції

тваринництва, комбікормах та преміксах традиційно використовують мікробіологічний метод [5–7].

Метою роботи було розробити мікробіологічний метод визначення вмісту амоксициліну в лікувальних кормах та встановити його придатність для контролювання їх якості на вміст у них цього антибіотика, а також визначити межу чутливості методу.

Матеріали і методи. Принцип методу оснований на дифузії амоксициліну, що міститься в зразку корму, в агарове середовище, інокульоване чутливим до цього антибіотика тест-мікроорганізмом. Величина зон затримки росту тест-культури прямо пропорційна вмісту амоксициліну в досліджуваному зразку корму. Для відбору найбільш чутливої тест-культури до амоксициліну використовували такі еталонні штами мікроорганізмів: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Micrococcus flavus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* 209-P. Культури засівали в середовище Мюллер-Хінтона для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків, виробництва фірми Hi Media Laboratories Pvt. Limited (Індія), на яке накладали стандартні паперові диски з амоксициліном цього ж виробництва. Після інкубації середовища за температури 35-37 °C упродовж 18 годин визначали діаметри зон затримки росту тест-культур навколо дисків з антибіотиком. Для дослідження використали комбікорм для птиці, у який додали препарат ремокс, виробництва фірми ІНВЕСА (Іспанія), так, щоб вміст антибіотика в готовому лікувальному кормі становив 250 мг/кг.

Для екстракції брали 10 г приготовленого таким чином зразку лікувального корму, який екстрагували фосфатним буферним розчином (рН 8,0), підігрітим до 80 °C. Далі додавали метанол, струшували та центрифугували. Верхній шар відбирали та розводили фосфатним буфером, рН 8, таким чином, щоб отримати серію робочих розчинів досліджуваного зразку з концентрацією амоксициліну: 0,32, 0,16, 0,08 і 0,04 мкг/см³. Паралельно зі стандарту амоксициліну готували основний стандартний розчин концентрації 1000 мкг/мл, з якого шляхом послідовних розведень фосфатним буфером, рН 7,0 готували робочі стандартні розчини концентрації 0,32, 0,16, 0,08 і 0,04 мкг/см³.

Вирощування тест-культури та приготування бактеріальної суспензії здійснювали згідно зі схемою, наведеною у таблиці 1.

Таблиця 1

Вирощування тест-культури *Micrococcus luteus* ATCC 9341 та приготування бактеріальної суспензії

Назва культури	Посів у пробірки				Приготування бактеріальної суспензії					
	Назва середовища	рН	t ⁰ інкубації, °C	Час інкубації, год.	Змив культури	Інокуляція у середовище	t ⁰ інкубації, °C	Час інкубації, Год.	Змив культури	Посівна доза
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	МПА	7,0-7,2	37	18–20	3 см ³ 0,8 % р-ну NaCl	0,3 см ³ у МПА, рН 8	50	18–20	3 см ³ 0,8 % р-ну NaCl	40 млн мікр. тіл/см ³

Інокульоване бактеріальною суспензією агарове середовище розливали в чашки Петрі. Чашки Петрі з внесеними в агарове середовище розчинами досліджуваного та стандартного зразків інкубували за температури 37 °C упродовж 18 годин. Після інкубації вимірювали зони затримки росту тест-мікроорганізму навколо лунок і визначали їх середню величину. Розрахунок вмісту амоксициліну проводили за стандартною кривою.

Для встановлення нижньої границі визначення вмісту амоксициліну в лікувальному кормі нами були приготовлені модельні проби комбікорму з різним вмістом амоксициліну (100, 50, 30, 20, 10, 9, 7, 5 і 0 мг/кг). Дослідження проводили у трьох повторностях за вище описаною методикою.

Результати й обговорення. Результати вивчення чутливості еталонних штамів мікроорганізмів до амоксициліну наведені таблиці 2.

Отримані результати показали, що найбільш чутливим до амоксициліну виявився тест-мікроорганізм *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

Таблиця 2

Чутливість тест-мікроорганізмів до амоксициліну

Мікроорганізми	Діаметри зони затримки росту мікроорганізмів навколо диску з амоксициліном, мм
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	32
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	31
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	30

При визначенні мікробіологічним методом вмісту амоксициліну в приготовленому комбікормі з внесеним у нього антибіотиком в дозі 250 мг/кг корму нами була отримана величина концентрації амоксициліну в досліджуваному зразку лікувального корму на рівні 240 мг/кг комбікорму, що становить 96 % від фактичного вмісту антибіотика. Це свідчить про придатність мікробіологічного методу для проведення контролювання якості лікувального корму, активно діючою речовиною якого є амоксицилін, за показником «вміст діючої речовини».

Результати визначення нижньої межі чутливості та ступеня точності мікробіологічного методу визначення вмісту амоксициліну в лікувальних кормах наведена у таблиці 3.

Таблиця 3

Визначення вмісту амоксициліну в досліджуваних зразках корму

Вміст антибіотика в кормі, мг/кг	Отриманий результат, мг/кг		
	1	2	3
100	98,8	97,3	99,1
50	51,5	50,6	52
30	28,9	30,1	29,2
20	19,7	19,9	20,2
10	9,8	10,1	9,9
9	—	—	—
7	—	—	—
5	—	—	—
0	—	—	—

Як впливає з результатів, наведених у таблиці 3, найнижча межа чутливості методу встановлена на рівні 10 мг амоксициліну на кг корму, тобто за цієї концентрації антибіотика в модельному зразку комбікорму спостерігали чітко окреслені зони затримки росту тест-культури *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Вже за концентрації амоксициліну в кормі 9 мг/кг і нижче зони інгібіції тест-мікроорганізму не утворювалися. Отже, межа чутливості методу є значно нижчою за концентрацію цього антибіотика, яку, зазвичай, використовують для приготування лікувального корму (250–500 мг/кг). При визначенні вмісту амоксициліну в модельних зразках комбікорму похибка в отриманій величині не перевищувала 5 % від фактичної концентрації антибіотика у кормі.

ВИСНОВКИ

Визначення вмісту активно діючої речовин в лікувальному кормі є одним із основних показників його якості. Мікробіологічні методи залишаються одними з найбільш застосовуваних методів для встановлення вмісту антимікробних речовин у хіміотерапевтичних препаратах. Це стосується і лікувальних кормів. Межа чутливості та точність мікробіологічного методу визначення вмісту амоксициліну в лікувальних кормах дозволяє застосовувати його при контролюванні їх якості за показником «вміст діючої речовини».

Перспективи подальших досліджень. Розробка нових ефективних методик визначення вмісту антимікробних речовин в лікувальних кормах сприятиме підвищенню рівня контролю їх якості.

**MICROBIOLOGICAL METHOD FOR DETERMINATION OF AMOXICILLIN
IN THE MEDICATED FEEDING STUFFS**

S U M M A R Y

One of the main indicators of quality of medicinal feed is the amount of the active ingredient or ingredients. Microbiological methods of determination the quantity of antimicrobial agents are in chemotherapeutic preparations, as well as in medicated feeding stuffs and premixes, remain one of most used during their quality control after an index «Content of active ingredient». In the article the results of approbation of method of determination of content of amoxicilin in medical feeding stuffs by the microbiological method of diffusion in a agar are given. The obtained results showed that the limit of sensitiveness of microbiological method for determination of content amoxicilin in medical feeding stuffs is 10 mg/kg of the mixed fodder, and an error in exactness of determination does not exceed 5 %.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМОКСИЦИЛЛИНА В ЛЕЧЕБНЫХ КОРМАХ

В. П. Музыка, Т. И. Стецко, О. В. Купецкая, О. З. Балян, М. В. Пашиковская

Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

Одним из основных показателей качества лечебных кормов является количество действующего вещества или веществ. Микробиологические методы определения количества антимикробных веществ в химиотерапевтических препаратах, а также в лечебных кормах и премиксах, остаются одними из наиболее применяемых при проведении контролирования их качества за показателем «Содержание действующего вещества». В статье приведены результаты апробирования методики определения содержания амоксициллина в лечебных кормах микробиологическим методом диффузии в агар. Полученные результаты показали, что граница чувствительности микробиологического метода для определения содержания амоксициллина в лечебных кормах составляет 10 мг/кг комбикорма, а ошибка в точности определения не превышает 5 %.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Франклин Т. Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. — М.: Мир, 1984. — 238 с.
2. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии / В. Ф. Ковалёв, И. Б. Волков, Б. В. Виолин, Р. А. Ортман, В. С. Хоменко, Р. Н. Хоменко — М.: Агропромиздат, 1988. — 223 с..
3. Linton A. H., Hedges A. J., Bennett P. M. Monitoring for the development of antimicrobial resistance during the use of olaquinox as a feed additive on commercial pig farms // J. Appl. Bacteriol. — 1988. — Vol. 64, № 4. — P. 311–327.
4. Ковалец Магдалена. Антибіотики — бомба уповільненої дії // Лабораторна діагностика. — 2002. — № 3. — С. 29–31.
5. Косенко Ю. М., Стецько Т. І., Святоцька Л. О., Хом'як О. І., Угрин Г. П. Експрес-методи визначення залишків антибіотиків у продуктах тваринництва // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. — 2005. — Вип. 6, № 3,4. — С. 173–179.
6. Korsrud G. O. Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial Veterinary Drug Residues in Slaughtered Animals // Journal of AOAC International. — 1998. — Vol. 81, № 1. — P. 21–24.
7. Beverley S., Sharman M. Improvement to the screening of antimicrobial drug residues in food by the use of Premi Test // Veterinary Science. — 2001. — Vol. 70, № 4.

Рецензент — кандидат сільськогосподарських наук І. М. Кушнір, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.