

СКРИНІНГ НАЯВНОСТІ АНТИБІОТИКІВ У НАТУРАЛЬНОМУ МЕДІ

В. П. Музика, Т. І. Стецько, Л. О. Святоцька, С. Д. Мурська, О. І. Хом'як, Г. П. Угрин

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

У країнах ЄС продукція бджільництва не повинна містити залишкові кількості антибіотиків. Відсутність їх у меді є одною із умов дозволу на його експорт в країни Європейського співтовариства. Незважаючи на досить низьку межу чутливості мікробіологічного якісного скринінг-методу визначення хлортетрацикліну та стрептоміцину в меді (100 мг/кг — для хлортетрацикліну і 10 мг/кг — для стрептоміцину), цей метод не може бути використаний при контролюванні якості меду при його експортуванні в країни ЄС. Ці методики можуть використовуватися при контролюванні продукції бджільництва, яка йде на експорт у країни, де немає таких жорстких обмежень щодо вмісту залишків антибіотиків у меді, а також у виробничій практиці ветеринарно-санітарної експертизи в Україні у випадках, коли у ветеринарно-санітарному паспорті пасіки зазначено про її неблагополуччя щодо бактеріальних хвороб, оброблення бджіл антибіотиками, у випадку отруєння бджіл, при перевірці кормових запасів бджолиних сімей, що йдуть на зимівлю.

Антибіотики — це речовини, що виділяються мікроорганізмами і рослинами, а також їх синтетичні аналоги, які володіють здатністю затримувати ріст або знищувати певні види мікроорганізмів. У бджільництві антибіотики використовують як біостимулятори, здатні підвищувати продуктивність бджолородин, як профілактичні та лікувальні засоби проти інфекційних захворювань бджіл. Застосовують як нативні (біовіт), так хімічно чисті антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин, тетрацикліни, левоміцетин). Ці препарати застосовуються як лікувально-профілактичні засоби при гнильцевих захворюваннях бджолородин, паратифі та септицемії бджіл.

В Європі введені обмеження на залишкові кількості антибіотиків у меді, або точніше, постановили, що антибіотиків у меді взагалі не повинно бути. Це означає, що вони не мають застосовуватися в лікуванні бджіл. У Сполучених Штатах Америки і Канади у нормативно-технічних документах вказується, мед не повинен мати у своєму складі сторонніх речовин, у протилежному випадку він вважається фальсифікованим. Антибіотики, що містяться в меді, розцінюють як сторонні речовини, а такий мед — як фальсифікований. Державним комітетом ветеринарної медицини України проводиться робота щодо гармонізації вітчизняного законодавства з питань ветеринарної медицини до вимог ЄС та СОТ. Це стосується і галузі бджільництва. Наявність Планів державного моніторингу залишкової кількості ветеринарних препаратів та забруднювачів у меді є однією з умов отримання права на експорт меду до країн Європейського Співтовариства. У результаті співпраці ДКВМ України і Генерального директорату Європейської Комісії з питань захисту здоров'я та прав споживачів рішенням Європейської Комісії № 2004/432/ЄС від 29.04.2004 були схвалені Плани державного моніторингу залишкової кількості ветеринарних препаратів та забруднювачів у меді, а українським виробникам було дозволено здійснювати експорт продукції бджільництва до країн-членів ЄС [1–3]. Ці документи дали право українським бджолярам розширити ринок збуту продукції бджільництва. З іншого боку, на них лягла величезна відповідальність за якість та безпечність продукції, яку вони виробляють. У першу чергу ця проблема гостро стоїть перед тими, хто хоче імпортувати свій мед, а також перед гуртовими закупниками продукції бджільництва, які будуть вивозити її за межі країни. Такий продукт повинен відповідати жорстким вимогам ЄС, у тому числі вимогам Директив 96/22/ЄЕС та 96/23/ЄЕС, Постанови Ради (ЄС) 2377/90 [4–6].

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) [7], передбачає визначення у бджолиному меді лише двох антибіотиків: тетрацикліну та стрептоміцину, що значно менше кількості забруднювачів, передбачених Директивами ЄС, які підлягають обов'язковому контролю в Європі. Тому, план

державного моніторингу залишкових кількостей ветеринарних препаратів та забруднюючих речовин у меді передбачає поступове впровадження методик визначення залишків цілої низки інших антимікробних речовин. Впровадження в практику нових методів визначення забруднюючих речовин у меді, у першу чергу антибіотиків, сприятиме підвищенню рівня контролю якості та безпечності продукції бджільництва.

Метою нашої роботи було апробування та встановлення межі чутливості якісних мікробіологічних методів визначення хлортетрацикліну і стрептоміцину в меді.

Методи і матеріали. Найбільш чутливі до хлортетрацикліну та стрептоміцину тест-мікроорганізми встановлювали методом дифузії в агар з використанням стандартних дисків з цими антибіотиками, а також визначали їх мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) для досліджуваних тест-культур методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі (МПБ). Для дослідження використовували музейні штами спороутворюючих бактерій роду *Bacillus*: *Bacillus mycoides* 537, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* варіант *L*₂, *Bacillus cereus* ATCC 11778 (отримані з УКМ Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного).

Для встановлення межі чутливості мікробіологічного методу визначення залишків хлортетрацикліну і стрептоміцину в меді був проведений дослід на модельних зразках меду з різним вмістом цих антибіотиків (хлортетрацикліну — 400, 200, 100, 90, 80, 70, 60 і 50 мкг/кг; стрептоміцину — 200, 100, 50, 20, 10, 9, 7, 5 і 0 мкг/кг). Перед визначенням зразки меду прогрівали упродовж 10 хв. за температури 60 °С для усунення його антибактеріальних властивостей. У чашках Петрі в лунки, зроблені в агаровому середовищі, інокульованому суспензією спор відповідних тест-мікроорганізмів, вносили приготовлені зразки меду, розбавлені фосфатним буфером у відношенні 1 : 5. Чашки інкубували упродовж 18-20 год за температури 37 °С. Після інкубації чашки оглядали — наявність зон затримки росту тест-культури навколо лунок вказувало на присутність у меді антибіотика.

Результати й обговорення. В основі мікробіологічного методу визначення антибіотиків хлортетрацикліну і стрептоміцину лежить принцип дифузії в агар, тобто здатності антибіотиків дифундувати в щільне поживне середовище, інокульоване тест-мікроорганізмом, викликаючи затримку його росту. Це проявляється появою в агарі чітко окреслених, чистих від росту тест-культури, зон. Відмінність у визначенні хлортетрацикліну і стрептоміцину полягає у використанні різних тест-культур, середовищ та буферних розчинів. Діаметри зон затримки росту тест-культур навколо стандартних дисків з антибіотиками хлортетрацикліну і стрептоміцину наведені у таблиці 1.

Результати визначення МІК хлортетрацикліну і стрептоміцину для досліджуваних штамів тест-мікроорганізмів наведені у таблиці 2.

Виходячи з отриманих результатів, МІК хлортетрацикліну для *Bacillus mycoides* 537 становить 9,35 мкг/см³, для *Bacillus subtilis* ATCC 6633 — 4,65 мкг/см³, для *Bacillus subtilis* *L*₂ — 2,35 мкг/см³, для *Bacillus cereus* ATCC 11778 — 4,65 мкг/см³. МІК стрептоміцину для *Bacillus mycoides* 537 становить 4,65 мкг/см³, для *Bacillus subtilis* ATCC 6633 — 1,2 мкг/см³, для *Bacillus subtilis* *L*₂ — 2,35 мкг/см³, для *Bacillus cereus* ATCC 11778 — 2,35 мкг/см³.

Таблиця 1

Діаметри зон затримки росту тест-мікроорганізмів навколо стандартних дисків з антибіотиками, мм

Антибіотики	Тест мікроорганізм			
	<i>Bacillus mycoides</i> 537	<i>Bacillus mycoides</i> 537	<i>Bacillus mycoides</i> 537	<i>Bacillus mycoides</i> 537
Хлортетрациклін	18	18	18	18
Стрептоміцин	22	22	22	22

Таблиця 2

МІК хлортетрацикліну і стрептоміцину для тест-мікроорганізмів родини *Bacillus*, мкг/мл

Антибіотики	Тест-мікроорганізм	Розведення антибіотика, мкг/мл									
		50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1
Хлортетрациклін	<i>B. mycoides</i> 537	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	<i>B. subtilis</i> варіант <i>L</i> ₂	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+

	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
Стрептоміцин	<i>B. mycoides</i> 537	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	<i>B. subtilis</i> варіант <i>L</i> ₂	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+

Примітка: “—” - прозорий бульйон; “+” - помутніння бульйону.

Таким чином, визначення чутливості досліджуваних тест-мікроорганізмів до хлортетрацикліну та стрептоміцину як диско-дифузійним методом, так і шляхом визначення їх мінімальної інгібуючої концентрації для тест-культур, показав, що найбільш чутливим до хлортетрацикліну є *Bacillus subtilis* *L*₂, а до стрептоміцину — *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Результати визначення найнижчого рівня визначення наявності хлортетрацикліну в меді мікробіологічним скринінг-методом наведена в таблиці 3.

Таблиця 3

Межа чутливості мікробіологічного скринінг-метода визначення хлортетрацикліну в меді

Концентрація хлортетрацикліну в меді, мг/кг	Отриманий результат
400	+
200	+
100	+
90	—
80	—
80	—
70	—
60	—
50	—

Примітка: у цій та наступній таблиці :“+” - наявність зони інгібіції; “—” - відсутність зони інгібіції.

Як випливає з результатів, наведених у таблиці 3, найнижчий рівень визначення наявності хлортетрацикліну в меді якісного мікробіологічного скринінг-методу становить 100 мкг/г.

Результати визначення найнижчої межі чутливості мікробіологічного скринінг-методу для визначення стрептоміцину в меді наведена в таблиці 4.

З наведених у таблиці 4 даних видно, що найнижчий рівень визначення стрептоміцину в меді мікробіологічним скринінг-методом становить 10 мкг/кг.

Таблиця 4

Межа чутливості мікробіологічного скринінг-метода для визначення стрептоміцину в меді

Концентрація стрептоміцину в меді, мкг/кг	Отриманий результат
200	+
100	+
50	+
20	+
10	+
9	—
7	—
5	—
0	—

ВИСНОВКИ

Зважаючи на те, що у продукції бджільництва, яка йде на експорт у країни Євросоюзу, не повинні міститися залишки антибіотиків, мікробіологічний якісний скринінг-метод визначення хлортетрацикліну та стрептоміцину в меді може використовуватися лише при контролюванні продукції бджільництва, яка йде на експорт у країни, де немає таких жорстких обмежень щодо вмісту залишків антибіотиків у меді, а також у практиці ветеринарно-санітарної експертизи продукції бджільництва в Україні у випадках, коли у ветеринарно-санітарному паспорті пасіки

зазначено про неблагополуччя її щодо бактеріальних хвороб, оброблення бджіл антибіотиками і у випадку отруєння бджіл, а також при перевірці кормових запасів бджолиних сімей, що йдуть на зимівлю.

Перспективи подальших досліджень. Розширення методичної бази визначення вмісту антибіотиків у меді сприятиме підвищення рівня контролю якості та безпечності для споживача продукції бджільництва.

SCRINING OF PRESENCE BY ANTIBIOTIC IN NATURAL HONEY

V. P. Muzyka, T. I. Stetsko, L. O. Svyatotska, S. D. Murska, O.I. Khomyak, G. P. Ugryn

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives

S U M M A R Y

In the countries of European Union the products of beekeeping must not contain the remaining amounts of antibiotics. Absence them in honey is one of terms of permission of its export in the countries of European community. In spite of enough low limit of sensitiveness of microbiological high-quality scrining-method of determination of chlortetracyclin and streptomycin in honey (100 µg/kg — for chlortetracyclin and 10 µg/kg — for streptomycin), this method can not be used in controlling of quality of honey at its exportation in the countries of ES. These methods can use at controlling of products of beekeeping, that goes to the export in countries, where such hard limitations are not in relation to maintenance of remaining amounts of antibiotics in honey, and also in production practice of veterinary-sanitary expertise in Ukraine in the cases when in the veterinary-sanitary passport of apiary it is marked about its unprosperity on bacterial illnesses, treatment of bees antibiotics, in the case of poisoning of bees, at verification of feed supplies of bee families, that go to wintering.

СКРИНИНГ НАЛИЧИЯ АНТИБИОТИКОМ В НАТУРАЛЬНОМ МЁДЕ

В. П. Музыка, Т. И. Стецко, Л. О. Святоцкая, С. Д. Мурская, О. И. Хомяк, Г. П. Угрин

Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

В странах Евросоюза продукция пчеловодства не должна содержать остаточные количества антибиотиков. Отсутствие их в мёде является одним из условий разрешения его экспорта в страны европейского сообщества. Несмотря на довольно низкую границу чувствительности микробиологического качественного скрининг-метода определения хлортетрациклина и стрептомицина в мёде (100 мкг/кг — для хлортетрациклина и 10 мкг/кг — для стрептомицина), этот метод не может быть использован в контроле качества мёда при его экспорте в страны ЕС. Эти методики могут использоваться при контроле продукции пчеловодства, что идёт на экспорт в страны, где нет таких жёстких ограничений относительно содержания остаточных количеств антибиотиков в мёде, а также в производственной практике ветеринарно-санитарной экспертизы в Украине в случаях, когда в ветеринарно-санитарном паспорте пасеки отмечено о её неблагополучности по бактериальным болезням, обработки пчёл антибиотиками, в случае отравления пчёл, при проверке кормовых запасов пчелиных семейств, что идут на зимовку.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Директива Ради ЄС 2001/110/ЄС від 20 грудня 2001 року стосовно меду. — 2001 — 17 с. (Council Directive 2001/110/EC 20.12.2001).

2. Щодо забезпечення виконання плану державного моніторингу залишкових кількостей токсикантів у меді на 20004 рік / Вказівка Головного державного інспектора ветеринарної медицини України № 7 від 14.04.2004.— К.: 2004. — 17 с.

3. Рішення ЄК № 2004/432/ЄС від 29 квітня 2004 року щодо схвалення планів контролю за залишками, які були надані третіми країнами, відповідно до Директиви 96/23/ЄЕС. — 2004. — 7с.
4. Директива Ради №96/22/ЄЕС від 29 квітня 1996 р. щодо заборони використання у скотарстві певних речовин, що мають гормональну чи тиростатичну дію та β -агоністів, а також, що відміняє Директиви 81/602/ЄЕС, 88/146/ЄЕС та 88/299/ЄЕС (OJ L 125, 23.5.1996, р. 3–9).
5. Директива Ради №96/23/ЄЕС від 29 квітня 1996 р. про заходи по контролю певних речовин та їх залишкового вмісту в живій худобі та продуктах тваринного походження, що відміняє Директиви 85/358/ЄЕС та 86/469/ЄЕС та Рішень 89/187/ЄЕС та 91/664/ЄЕС (OJ L 125, 23.5.1996, р. 10–32).
6. Постанова Ради (ЕЕС) 2377/90 від 26.06.90, що встановлює загальні процедури Співтовариства для визначення максимально допустимих рівнів залишкових кількостей дозволених речовин (ветеринарних препаратів тощо) у харчових продуктах тваринного походження.
7. «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)» / Наказ Державного департаменту ветеринарної медицини України № 16 від 03.11.1998. — К.: 1998. — 127 с.

Рецензент — к. с.-г. н. І. М. Кушнір, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.