

## **ЗАСТОСУВАННЯ ЕКСПРЕС-МЕТОДУ "PREMI®TEST" ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ В М'ЯСІ РИБИ**

Петров Р.В.

Фотіна Т.І.

romanpetrov1978@mail.ru

Сумський національний аграрний університет, м. Суми

*Анотація. В статті наведені дані щодо використання експрес-методу визначення антимікробних препаратів в рибі за допомогою тест-системи "Premi®Test" виробництва R-Biopharm AG. При порівняльній оцінці стандартного методу визначення наявності антибактеріальних препаратів шляхом дифузії в агар та експрес-методу, тест-система "Premi®Test" показала високу чутливість до визначення в м'ясі риби сульфаніламідів, тетрациклінів, макролідів, аміноглікозидів та антибіотиків пеніцилінового ряду, і не поступається стандартному методу дифузії в агар. Експрес-метод визначення залишків антибактеріальних препаратів в рибі "Premi®Test" може бути використаний для поточного аналізу на виробництві та при проведенні ветеринарно-санітарної оцінки риби в умовах державних лабораторій ветеринарно-санітарної експертизи на агропродовольчих ринках.*

*Ключові слова: риба, безпека, антибактеріальні препарати, Bacillus stearothermophilus, "Premi®Test".*

**Короткий огляд літератури.** Забезпечення населення екологічно чистими продуктами тваринництва одна з головних задач що стоїть перед агропромисловим комплексом України. Суттєву роль у вирішенні даної проблеми займає рибицтво, яке за короткий термін може забезпечити населення своєю продукцією. На заваді розвитку рибицтва стоять хвороби інфекційної етіології, для лікування та профілактики яких широко застосовують антибактеріальні препарати [2, 3, 8]. Використання продукції рибицтва з наявністю даних препаратів на рівні або вище максимально-допустимих рівнів (МДР) заборонена і може призвести при споживанні такої продукції до алергій, ідіосинкразій, дисбактеріозів, утворення антибіотикостійких штамів мікроорганізмів у людей, що у подальшому приводить до послаблення загальної резистентності людського організму [1, 4, 5, 7].

**Актуальність.** Для контролю за наявністю залишків антибактеріальних препаратів в продукції тваринного походження використовують такі методи як мікробіологічні, фізико-хімічні, імунологічні, біологічні та інші. Найбільш розповсюдженими є мікробіологічні методи контролю, які доволі дешеві, прості у виконанні і забезпечують отримання результату в короткі терміни. Вони дають можливість встановити наявність в продукції антимікробних речовин на рівні МДР або рівнях що перевищують МДР [1, 2, 6].

Найбільш поширеним є метод дифузії в агар з використанням однієї з паспортизованих тест-культур мікроорганізмів *Sar. lutea*, *St. aureus*, *Bac. subtilis*. В основі методу дослідження продуктів забою тварин на наявність антибіотиків лежить здатність багатьох видів антибіотиків затримувати ріст мікроорганізмів [2]. Недоліком даного методу, є достатньо тривалий час для постановки, проведення та обліку реакції (20-24 години), що ускладнює використання даної реакції при промисловому контролі риби та рибопродукції та в умовах державних лабораторій ветеринарно-санітарної експертизи на ринку.

Виходячи з вищевикладеного існує нагальна потреба у впровадженні експрес-методу виявлення антибактеріальних препаратів в рибі.

**Мета роботи:** застосувати експрес-метод для виявлення антибактеріальних препаратів в рибі з використанням тест-системи "Premi®Test".

**Матеріали і методи.** Дослідження проводились на базі кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва факультету ветеринарної медицини Сумського національного аграрного університету.

Для досягнення мети нами було створено 5 груп коропів віком два роки вагою  $240 \pm 14$  г по 12 особин ( $n=12$ ), кожній особині був наданий номер за допомогою бірки. В досліді використовували коропів отриманих з Сумського рибокомбінату, яким попередньо не задавали антибактеріальні препарати. Риба містилась в акваріумах місткістю 100 л., за температури  $19-20^{\circ}\text{C}$ , за допомогою штучної аерації концентрація кисню в воді підтримувалась на рівні  $7-10 \text{ г/м}^3$ .

Кожній групі вводили п'ять різних антимікробних препаратів: сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін і гентаміцин згідно таблиці 1.

Таблиця 1.

**Схема введення препаратів для проведення досліду**

| № особини<br>в групі<br>Препарат | 1-4      | 5-8       | 9-12      | Спосіб та<br>кратність<br>введення                   | МДР<br>мг/кг |
|----------------------------------|----------|-----------|-----------|------------------------------------------------------|--------------|
| Сульфадимезин                    | 50 мг/кг | 100 мг/кг | 200 мг/кг | 2 рази на добу п/о<br>з 1% крохмальним<br>клейстером | 100 мг/кг    |
| Окситетрациклін                  | 50 мг/кг | 100 мг/кг | 200 мг/кг | 1 раз на добу в/м                                    | 100 мг/кг    |
| Тілозин                          | 50 мг/кг | 100 мг/кг | 200 мг/кг | 1 раз на добу в/м                                    | 100 мг/кг    |
| Амоксицилін                      | 25 мг/кг | 50 мг/кг  | 100 мг/кг | 1 раз на добу в/м                                    | 50 мг/кг     |
| Гентаміцин                       | 25 мг/кг | 50 мг/кг  | 100 мг/кг | 1 раз на добу в/м                                    | 50 мг/кг     |

Для постановки реакції дифузійним методом попередньо, перед дослідженням, тест-культуру *Bac. subtilis* вирощували на м'ясо-пептоному бульйоні протягом доби за температури  $37^{\circ}\text{C}$ . На пластинчастий м'ясо-пептонний агар пастерівською піпеткою наносили 2-3 краплі бульйонної тест-

культури мікроорганізмів і ретельно розподіляли по його поверхні. Потім на поверхню агару на однаковій відстані один від одного і від країв чашки Петрі вміщували три досліджувані проби м'яса масою 2-3 г і паперовий диск, що містить 0,25 ОД пеніциліну. Чашку ставили спочатку в холодильник за температури 4-5°C на 5 год. (для дифузії антибіотиків з м'яса риби в поживне середовище), а потім у термостат за температури 37°C на 15-20 год. При наявності антибіотиків в пробі навколо шматочка м'яса риби виявляли зону затримки росту мікроорганізмів. Для контролю її порівнювали із зоною затримки росту навколо паперового диска, просоченого пеніциліном.

Для постановки реакції експрес-методом "Premi®Test" водну витяжку (1:10) з фаршу м'яса риби поміщали в готові до використання пробірки, давали настоятися 20 хв. за кімнатної температури для проходження процесу дифузії, після цього витяжку видаляли і промивали 3 рази дистильованою водою. Після цього пробірку поміщали в термостат за температури 64°C протягом 3 годин. Для врахування результатів реакції порівнювали колір індикатору: при відсутності у зразках антимікробних препаратів, спори проростають і розвиваються спричинюючи окислення середовища і зміну кольору (жовтий колір); при наявності залишків антимікробних препаратів, бактеріальний ріст не буде відбуватися, і фіолетовий колір буде вказувати на присутність антибіотиків на рівні або вище межі чутливості тесту.

**Результати роботи.** В своїх дослідях ми використали препарати які найбільш розповсюджені в рибористві і застосовуються для лікування та профілактики хвороб риби: сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін і гентаміцин.

Через добу після введення препаратів риба була забита, а зразки м'яса використані для дослідження в них залишкових кількостей антибактеріальних препаратів методом дифузії в агар та експрес-методом "Premi®Test".

В результаті досліджень дифузійним методом залишків антибактеріальних препаратів в м'ясі коропа були отримані дані, що відображені в табл. 2.

Таблиця 2

**Визначення в рибі антибактеріальних препаратів за допомогою методу дифузії в агар (n=4)**

| № особини<br>в групі | 1-4                                                | 5-8            | 9-12           |
|----------------------|----------------------------------------------------|----------------|----------------|
| Препарат             | кількість позитивних результатів / усього проб (%) |                |                |
| Сульфадимезин        | 0/4 (0%)                                           | 2/4 (50%)      | 4/4 (100%)     |
| Окситетрациклін      | 1/4 (25%)                                          | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     |
| Тілозин              | 2/4 (50%)                                          | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     |
| Амоксицилін          | 2/4 (50%)                                          | 3/4 (75%)      | 4/4 (100%)     |
| Гентаміцин           | 0/4 (0%)                                           | 1/4 (25%)      | 1/4 (25%)      |
|                      | <b>0,5×МДР</b>                                     | <b>1,0×МДР</b> | <b>2,0×МДР</b> |

Аналізуючи дані, наведені в табл. 2 можемо сказати, що дифузійний метод виявлення антимікробних препаратів в рибі не в усіх випадках виявився

ефективним. За наявності в м'ясі риби препаратів в половинній кількості від максимально-допустимих рівнів дифузійним методом не виявлявся сульфадимезин та гентаміцин; в половині випадків визначався тілозин та амоксицилін; в 25 % випадків визначався окситетрациклін. За умови наявності сульфадимезину на рівні МДР лише в 50 % випадків даний метод виявляв препарати в м'ясі риби; окситетрациклін та тілозин визначались зі 100 % ефективністю; гірше визначався амоксицилін – в 75 % випадків; і найгірше визначався гентаміцин – лише в 25% випадків був отриманий позитивний результат.

При збільшенні концентрації препаратів до двократного перевищення МДР – даний метод зі 100 % ефективністю виявляв сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін, але гентаміцин виявляв лише в 25 % випадків.

Витрата часу за умови проведення дослідження по виявленню залишків антибактеріальних препаратів дифузійним методом, не враховуючи підготовчого етапу, склала одна доба.

Результати досліджень зразків м'яса риби експрес-методом "Premi®Test" наведені в табл. 3.

Таблиця 3

**Визначення в рибі антибактеріальних препаратів за допомогою експрес-методу "Premi®Test" (n=4)**

| № особини<br>в групі | 1-4                                                | 5-8            | 9-12           |
|----------------------|----------------------------------------------------|----------------|----------------|
| Препарат             | кількість позитивних результатів / усього проб (%) |                |                |
| Сульфадимезин        | 0/4 (0%)                                           | 2/4 (50%)      | 4/4 (100%)     |
| Окситетрациклін      | 2/4 (50%)                                          | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     |
| Тілозин              | 3/4 (75%)                                          | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     |
| Амоксицилін          | 4/4 (100%)                                         | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     |
| Гентаміцин           | 0/4 (0%)                                           | 1/4 (25%)      | 3/4 (75%)      |
|                      | <b>0,5×МДР</b>                                     | <b>1,0×МДР</b> | <b>2,0×МДР</b> |

Аналізуючи дані, наведені в табл. 3 можемо сказати, що "Premi®Test" ефективно виявляв наявність антибактеріальних препаратів в м'язах при половинній концентрації МДР у пробах м'язової тканини риби: окситетрацикліну (50 %), тілозину (75%), амоксициліну (100 %); тест був нечутливий до сульфадимезину та гентаміцину.

"Premi®Test" ефективно виявляв наявність в м'язах риби на рівні 1,0×МДР таких препаратів як окситетрациклін (100 %), тілозин (100 %) та амоксицилін (100 %); сульфадимезин виявляв лише в половині випадків, а гентаміцин лише в 25 % випадків.

На рівні двохкратного перевищення максимально-допустимих рівнів експрес-тест виявляв усі зазначені препарати на рівні 100 %, крім гентаміцину, його рівень виявлення склав 75 %.

Витрата часу за умови проведення дослідження експрес-методом склала чотири години.

Таким чином, можемо сказати, що експрес-метод визначення залишків антибактеріальних препаратів в рибі "Premi®Test" показав себе ефективним. При використанні даного методу значно скорочується час на проведення досліджень, він простий у використанні, і не поступається по своїй чутливості методу дифузії в агар.

### **Висновки**

1. Обґрунтована ефективність застосування експрес-методу визначення антибактеріальних препаратів в рибі за допомогою тест-системи "Premi®Test", яка виявляє в м'язах риби на рівні МДР такі препарати як окситетрациклін, тілозин та амоксицилін (100 %); на рівні двохкратного перевищення МДР експрес-тест виявляв сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін на рівні 100 %; гентаміцин був виявлений в 75 % випадків.
2. Доведено, що експрес-метод для визначення антибактеріальних препаратів "Premi®Test" може бути використаний для поточного аналізу риби та рибної сировини в умовах виробництва, використання якого порівняно с дифузійним методом скорочує витрату часу до 4 годин на 25 проб.

**Перспективи подальших досліджень.** В перспективі планується розробити схему лікування та профілактики бактеріальних хвороб риби в промисловому рибництві з використанням ефективного екологічно чистого препарату.

### **Список використаної літератури**

1. Бремнер Г. Аллан Безопасность и качество рыбо- и морепродуктов [Текст] / Г. Аллан Бремнер; [пер. с англ. В. Широкова; науч. ред. Ю.Г. Стоянова]. – Спб.: Профессия, 2009. – 512 с.
2. Давыдов О.Н. Ветеринарно-санитарный контроль пищевых гидробионтов [Текст] / Давыдов О.Н., Абрамов А.В., Темниханов Ю.Д. – Черкаassy, изд-во "АНТ", 2007 – 458 с.
3. Давыдов О.Н. Биологические препараты и химические вещества в аквакультуре [Текст] / Давыдов О.Н., Абрамов А.В., Куровская Л.Я. – К.: Логос, 2009. – 307 с.
4. Калашникова А. Биологическая опасность рыбы и рыбной продукции для потребителя [Текст] / А. Калашникова // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2009. - № 7. - С. 7-8
5. Косенко Ю.М. Моніторинг залишків ветеринарних препаратів у харчових продуктах [Текст] / Ю.М. Косенко, В.І. Ткаченко, О.В. Лапін // Наук. Вісн. Львів. держ. акад. вет. медицини. - М-во аграр. політики України. – Л., 2002. – Т. 4 (№2), ч.5. – С. 202-207.
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) [Текст] : Нормативні директивні правові документи. – К., 2004. – С. 29-30.
7. Про безпечність та якість харчових продуктів [Текст] : Закон України // Відомості Верховної Ради України. – 1998. - №19. – С. 98.
8. Скурат Э.К. Новые антибиотики для профилактики и лечения

аэромонозов карпов в прудовых хозяйствах [Текст] / Э.К. Скурат, В.А. Сиволоцкая, Е.И. Гребнева // Вопросы рыбного хозяйства Белоруссии. - Академия аграрных наук. Минск. - 1996. - Вып. 14. - С. 101-104.

# **ЗАСТОСУВАННЯ ЕКСПРЕС-МЕТОДУ "PREMI®TEST" ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ В М'ЯСІ РИБИ**

УДК:619: 639.2.09; 639.3.09

**Петров Р.В., Фотіна Т.І.** Сумський національний аграрний університет,  
м. Суми

**Мета роботи:** обґрунтувати використання експрес-методу виявлення антибактеріальних препаратів в рибі з використанням тест-системи "Pemi®Test".

**Матеріали і методи.** Коропам задавалися п'ять різних антимікробних препаратів в трьох концентраціях: сульфадимезин (50, 100, 200 мг/кг), окситетрациклін (50, 100, 200 мг/кг), тілозин (50, 100, 200 мг/кг), амоксицилін (25, 50, 100 мг/кг) і гентаміцин (50, 100, 200 мг/кг). Коропи через добу забивалися, а зразки м'яса використовувалися для виявлення антибактеріальних препаратів дифузійним методом та експрес-методом.

**Результати роботи.** "Pemi®Test" ефективно виявляв наявність в м'язах риби на рівні МДР таких препаратів як окситетрациклін, тілозин та амоксицилін (100%); сульфадимезин виявляв лише в 50%, а гентаміцин лише в 25% випадків. На рівні двохкратного перевищення МДР експрес-тест виявляв усі зазначені препарати на рівні 100 %, крім гентаміцину, його рівень виявлення склав 75 %. Витрата часу за умови проведення дослідження експрес-методом склала чотири години.

Експрес-метод визначення залишків антибактеріальних препаратів в рибі "Pemi®Test" показав себе ефективним. При використанні даного методу значно скорочується час на проведення досліджень, він простий у використанні, і не поступається по своїй чутливості методу дифузії в агар.

## **Висновки**

1. Обґрунтована ефективність застосування експрес-методу визначення антибактеріальних препаратів в рибі за допомогою тест-системи "Pemi®Test", яка виявляє в м'язах риби на рівні МДР такі препарати як окситетрациклін, тілозин та амоксицилін (100 %); на рівні двохкратного перевищення МДР експрес-тест виявляв сульфадимезин, окситетрациклін, тілозин, амоксицилін на рівні 100 %; гентаміцин був виявлений в 75 % випадків.

2. Доведено, що експрес-метод для визначення антибактеріальних препаратів "Pemi®Test" може бути використаний для поточного аналізу риби та рибної сировини в умовах виробництва, використання якого порівняно з дифузійним методом скорочує витрату часу до 4 годин на 25 проб.

**Перспективи подальших досліджень.** В перспективі планується розробити схему лікування та профілактики бактеріальних хвороб риби в промисловому рибництві з використанням ефективного екологічно чистого препарату.

**Ключові слова:** риба, безпека, антибактеріальні препарати, *Bacillus*  
*stearothermophilus*, "Premi®Test".

# **ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕСС-МЕТОДА "PREMI®TEST" ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ОСТАТКОВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В МЯСЕ РЫБЫ**

**УДК:** 619: 639.2.09; 639.3.09

**Петров Р.В., Фотина Т.И.** Сумской национальный аграрный университет, г. Сумы

**Цель работы:** обосновать использование экспресс-метода выявления антибактериальных препаратов в рыбе с использованием тест-системы "Premi®Test".

**Материалы и методы.** Карпам задавались пять различных антимикробных препаратов в трех концентрациях: сульфадимезина (50, 100, 200 мг/кг), окситетрациклина (50, 100, 200 мг/кг), тилозина (50, 100, 200 мг/кг), амоксициллина (25, 50, 100 мг/кг) и гентамицина (50, 100, 200 мг/кг). Карпы через сутки забивались, а образцы мяса использовались для выявления антибактериальных препаратов диффузным методом и экспресс-методом.

**Результаты работы.** "Premi®Test" эффективно выявлял наличие в мышцах рыбы на уровне МДУ таких препаратов как окситетрациклина, тилозина и амоксициллина (100%); сульфадимезин выявляли лишь в 50%, а гентамицин только в 25% случаев. На уровне двукратное превышение МДУ экспресс-тест проявлял все указанные препараты на уровне 100%, кроме гентамицина, его уровень обнаружения составил 75%. Расход времени при условии проведения исследования экспресс-методом составила четыре часа.

Экспресс-метод определения остатков антибактериальных препаратов в рыбе "Premi®Test" показал себя эффективным. При использовании данного метода значительно сокращается время на проведение исследований, он прост в использовании, и не уступает по своей чувствительности методу диффузии в агар.

**Выводы** 1. Обоснована эффективность применения экспресс-метода определения антибактериальных препаратов в рыбе с помощью тест-системы "Premi®Test", которая выявляет в мышцах рыбы на уровне МДУ такие препараты как окситетрациклин, тилозин и амоксициллин (100%); на уровне двукратного превышения МДУ экспресс-тест выявлял сульфадимезин, окситетрациклин, тилозин, амоксициллин на уровне 100%; гентамицин был обнаружен в 75% случаев.

2. Доказано, что экспресс-метод для определения антибактериальных препаратов "Premi®Test" может быть использован для текущего анализа рыбы и рыбного сырья в условиях производства, использование которого сравнительно с диффузным методом сокращает расход времени на 4 часа на 25 проб.

**Перспективы дальнейших исследований.** В перспективе планируется разработать схему лечения и бактериальных болезней рыбы в промышленном рыбоводстве с использованием эффективного экологически чистого продукта.

**Ключевые слова:** рыба, безопасность, антибактериальные препараты,  
Bacillus stearothermophilus, "Premi®Test".

## OF RAPID METHOD "PREMI®TEST" FOR DETECTION OF RESIDUES OF ANTIBACTERIAL DRUGS IN THE FLESH

**UDC:** 619: 639.2.09; 639.3.09

**Petrov R.V., Fotina T.I.** Sumy National Agrarian University, Sumy

**Objective:** To justify the use of rapid detection method antimicrobials in fish using the test system "Premi®Test".

**Materials and methods.** Carp asked five different antimicrobials in three concentrations: sulfadimezin (50, 100, 200 mg/kg) oksitetratsyklin (50, 100, 200 mg/kg) tilozyn (50, 100, 200 mg/kg), amoxicillin (25, 50, 100 mg/kg) and gentamicin (50, 100, 200 mg/kg). Carp were killed in a day, and meat samples were used to identify antibacterial drugs by diffusion and rapid method.

**The results.** "Premi®Test" effectively showed the presence of fish muscle at the level of MRL drugs such as oksitetratsyklin, tilozyn and amoxicillin (100%); sulfadimezin showed only 50% and gentamicin only 25% of cases. At the level of excess double MRL rapid test showed all these drugs at 100%, including gentamicin, its detection rate was 75%. Time spent subject to express research method was four hours.

Rapid method for determination of residues of antibacterial agents in fish "Premi®Test" has shown itself effective. When using this method significantly reduces the time to research, it is easy to use, and not inferior to its sensitivity agar diffusion method.

### **Conclusions**

1. The effectiveness of the use of rapid method for determining antimicrobial drugs in fish using the test system "Premi®Test", which detects muscle of fish at MRL drugs such as oksitetratsyklin, tilozyn and amoxicillin (100%); at dvochkратноho excess MRL rapid test showed sulfadimezin, oksitetratsyklin, tilozyn, amoxicillin at 100%; gentamicin was detected in 75% of cases.

2. It is proved that a rapid method for the determination of antibacterial drugs "Premi®Test" can be used to analyze the current fish and fish raw materials in production, the use of which in comparison with diffusion method reduces time spent 4 hours in 25 samples.

**Prospects for further research.** There are plans to develop a scheme for the treatment and prevention of bacterial diseases of fish in the industrial fishery using efficient, environmentally friendly product.

**Key words:** fish, security, antibiotics, *Bacillus stearothermophilus*, "Premi®Test".