

На правах рукописи

КОЖИН ЮРИЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

**ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА МЯСА ПТИЦ
С ОСТАТОЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ
МАКРОЛИДОВ**

16.00.06 - ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и
ветеринарно-санитарная экспертиза

Кожин

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань - 2005

Работа выполнена на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы
ФГОУ ВПО "Казанская государственная академия ветеринарной
медицины им. Н.Э. Баумана"

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Волков Али Харисович

Официальные оппоненты: -доктор ветеринарных наук, профессор
Софронов Владимир Георгиевич
-доктор биологических наук, профессор
Конюхов Геннадий Владимирович

Ведущее учреждение: ФГОУ ВПО "Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия"

Защита диссертации состоится «14» февраля 2005 г. в 10.00 часов
на заседании диссертационного совета Д 220-034-01 при ФГОУ ВПО
«Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э.
Баумана» (420074, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 35)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО
«Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э.
Баумана»

Автореферат разослан « 11 » января 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук, профессор

 М.С. Ежкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Повышение благосостояния людей неразрывно связано с улучшением снабжения населения продуктами питания. Важная роль в росте производства продуктов питания принадлежит птицеводству как наиболее интенсивной отрасли животноводства. Повышение эффективности этой отрасли во многом зависит от внедрения прогрессивных технологий. В настоящее время и современном отечественном птицеводстве развиваются новые направления по созданию безотходного производства с высоким уровнем санитарно - ветеринарной обеспеченности птицеводческих предприятий с единым замкнутым технологическим процессом (В. И. Малофеев, 1986; К.Х. Папуниди и др., 2000; А.В. Якимов и др., 2001). Повышается уровень селекционно-племенной работы по совершенствованию племенных и продуктивных качеств птицы, созданию новых высокопродуктивных пород линий и гибридов, отвечающих требованиям промышленной технологии. Происходит техническое перевооружение в комбикормовой промышленности и т.п. (М.Г.Петраш, 1985; Т. Щербатова, 1994; Б.Ф. Бессарабов, 2001).

Интенсификация и концентрация производства обуславливает не только внедрение новых технологий, но и предусматривает создание стойкого благополучия птицеводческих предприятий по инфекционным и незаразным болезням, получение продуктов высокого санитарного качества (В.М.Митюшников, 1985; В.А. Макаров, В.П. Фролов, Н.Ф. Шуклин, 1991; М.П. Бутко, Ю.Г. Костенко, 1994; С.А. Артемьева и др., 2003).

При промышленном интенсивно-поточном способе ведения животноводства, когда на ограниченных площадях, под одной крышей сосредотачиваются десятки тысячи животных, кроме проведения общих ветеринарно-санитарных мероприятий, неуклонно, возрастает и применение различных лечебно-профилактических лекарственных средств, биологически активных веществ, большую долю которых составляют антимикробные препараты (В.И.Аксенов, В.Ф.Ковалев, 1977; М.И.Лотенков, 1979; В.А. Кузьмин, Г.Г. Сорокина, 1997; А.Б. Байдевятов, 1992; Д.А. Алтунин и др., 1999; Ш.А. Имангулова и др., 2001; А.В. Малков и др., 2002).

Из большого арсенала используемых в животноводстве антибиотиков, препараты тилозина в последнее время нашли широкое применение в ветеринарной практике. Экономические выгоды от применения антибиотиков очевидны. Однако при этом возникает возможность загрязнения ими продуктов животноводства, используемых в питании, что ставит перед гигиенистами задачу- исключить опасность потребления загрязненных продуктов (М.Ф. Нестерина с соавт. 1974; В.И.

Аксенов, В. Ф. Ковалев, 1977; Л.С. Припутина, О.Д. Ольшанская, Т.В. Воробьева, Ж.Я. Жильская, 1982). По санитарному законодательству в нашей стране наличие антибиотиков в продуктах питания не допускаются (А.Н. Ёншина, Р.Л. Патент, М.М. Дубенецкая, 1980; Л. С. Припутина, О.Д. Ольшанская, Ж. Я. Жильская, 1988).

В Финляндии же убой на мясо разрешен через 6 дней после окончания лечения препаратами тилозина, при этом проводят обязательное исследование мяса на наличие остатков антибиотика (R. Berqer, 1971).

В США срок ожидания между последним введением антибиотика тилозина и убоем животного 8 дней (Houweling, 1970; Herrick, 1971; Jdaho Farmer- Stockman, 1981).

Следует отметить, что у исследователей по срокам выдержки животных до убоя после использования препаратов тилозина нет единых рекомендаций, что свидетельствует о недостаточной изученности данной проблемы. К тому же, имеются многочисленные данные, что препараты тилозина являются сильными аллергенами для животных, а продукты убоя могут быть более токсичными и оказывать нежелательное влияние на здоровье человека. (V.Weqe 1969; J.Raynaud, 1969; В.Ф.Грезин, В.М.Гулин, В. И. Аксенов, В. Ф. Ковалев, 1973; Farm-Store, 1977; В. Ф. Ковалев, 1978; J.Boisseau, 1982; А.М.Иваницкий, 1982; Л.С.Припутина, О.Д.Ольшанская, Ж.Я.Жильская, 1988). Кроме того, установлено, что остаточные количества некоторых биологически активных веществ, содержащиеся в продуктах питания обладают канцерогенным, тератогенным, мутагенным действием (W.Laue, G.Scheibner, S.Baldauf, H.Trolldenier, W.Pietsch 1979).

В доступной литературе отсутствуют данных о влиянии остаточных количеств тилозина на качественные показатели мяса кур и о ветеринарно-санитарной его оценке, о биологической ценности и безвредности такого продукта. Возникает необходимость разработки высокочувствительных, простых и доступных методов определения содержания антибиотиков из группы макролидов в мясе для ветеринарной практики.

В связи с этим диссертационная работа представляет не только научное, но и практическое значение.

Цель и задачи исследований. Основной целью наших исследований являлось усовершенствование методов ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов убоя птиц, получавших антибиотики группы макролидов. При этом ставились следующие задачи:

- изыскать и разработать наиболее пригодный для практического применения метод качественного и количественного определения препаратов тилозина в мясе птиц;
- выяснить особенности распределения тилозина в тканях кур и скорость его разрушения или выведения из организма;
- определить биологическую ценность и безвредность мяса кур с остаточным количеством антибиотиков;
- разработать методику ветеринарно-санитарной оценки мяса кур при

содержании в нем антибиотиков группы макролидов.

Научная новизна. Впервые выполнено комплексное исследование по нескольким показателям качества мяса кур, получавших перорально препараты тилозина. В динамике дана научно-обоснованная ветеринарно-санитарная оценка качества мяса кур при максимальном в нем содержании антибиотиков и в процессе выведения их из организма птиц и на их основе выработаны оптимальные сроки выдержки кур перед убоем. Получены новые данные, позволяющие более рационально и эффективно решать вопрос использования продуктов убоя птиц, получавших с кормом препараты из группы макролидов.

Получены данные об отличии мяса опытных птиц при содержании в них тилозина, от мяса контрольных, не получавших антибиотики по общепринятым физико-химическим показателям, аминокислотному составу и индексу пищевой ценности белка. Выявлена степень разрушения тилозина в динамике в органах и тканях кур в различные сроки хранения в замороженном состоянии при температуре $-6-8^{\circ}\text{C}$ и продолжительности варки.

Практическая ценность. В экспериментальном и производственном опытах установлено, что остатки препаратов тилозина после однократного перорального применения сохраняются в организме птиц /легкие и костный мозг/ довольно продолжительное время /от 15 до 18 суток/, а наиболее ценные в пищевом отношении части тушек /красные, белые мышцы и кожа/ кур за сутки до убоя полностью освобождаются от антибиотика.

Результаты исследований внедрены в производство через Орловский и Воронежский межотраслевые территориальные центры научно-технической информации и пропаганды (№ 24 - 1986; №№ 38, 123, 142-1988; № 155-1989).

Установленные закономерности могут быть использованы для решения вопроса более рационального использования в пищу мяса кур, получавших до убоя перорально антибиотики группы макролидов.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- микробиологический метод с использованием тест культуры *V. subtilis* наиболее целесообразен для определения количественных и качественных концентраций наличия препаратов тилозина в мясе птиц;

- кур, получавших перорально тилозин, необходимо выдерживать двое суток перед убоем, с последующим использованием мяса без ограничения и утилизацией внутренних органов на кормовые цели;

- мясо кур, получавших тилозин, биологически полноценно, не обладает аллергическими, токсичными и мутагенными свойствами в опытах на лабораторных животных.

Апробация работы. Основные теоретические и практические положения диссертационной работы доложены и получили положительную оценку на научных конференциях Международных и

Всероссийских научных конференциях: "Экологические аспекты эпизоотологии и патологии животных", "Научные аспекты профилактики и терапии болезней сельскохозяйственных животных" (Воронеж, 1996, 1997, 1999) и Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана (Казань, 1999-2004гг.).

Публикация результатов исследований. Основные теоретические и научные положения и практические рекомендации изложены в 10 научных работах, которые отражают основное содержание диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах компьютерного текста и состоит из общей характеристики работ, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических предложений, списка литературы и приложения. Материалы диссертации иллюстрированы 24 таблицами, 2 графиками, 1 диаграммой. Список литературы включает 192 источника, в том числе 47 на иностранных языках.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Основная часть исследований по определению остаточных количеств препаратов группы микролидов в мясе птиц, изучение органолептических биохимических и физико-химических показателей продуктов убоя выполнены в 1985-2004 гг. на кафедре ветсанэкспертизы ФГОУ ВПО "Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана" и в племптицесовхозе «Воронежский» Новоусманского района Воронежской области. Номер государственной регистрации 01980005947.

В экспериментах использовано 147 различного (от 80 до 140 дн.) возраста цыплят породы Леггорн, кросса Хайсекс белый К₅В₄ голландской фирмы «Еврибрид». Птица данного кросса отличается ранней скороспелостью и очень высокой продуктивностью.

В наших исследованиях также использованы 56 белых беспородных крыс из питомника лабораторных животных АМН РФ «Белый Мох», 20 морских свинок и 7 белых мышей.

В качестве тест-культур нами использовались микробная взвесь "Sarcina lutea ATCC 9341 и штаммы споровых бактерий - Bacillus: subtilis ATCC 6633, subtilis L₂, mycoides 537, mycoides HB, которые были предоставлены сотрудниками ВГНКИ ветеринарных препаратов.

Материалом для исследований служили грудные и бедренные мышцы, печень, почки, легкие, селезенка, сердце, кожа, жир, костный мозг птиц. Птица для экспериментов нами подбирались по принципу аналогов, которые содержались в условиях вивария академии в стандартных клетках.

По определению содержания тилозина в органах и тканях птиц применялся модифицированный нами существующий количественный микробиологический метод диффузии в агар с использованием специального

ферментативного извлечения из исследуемого материала антибиотика пепсином, предложенное Scheibner (1970) и для определения тетрациклинов, стрептомицина, мономицина и неомицина, разработанное Л/Г. Даниеловой (1972). Микробиологическим методом диффузии в агар нами определено содержание препаратов тилозина в более чем 1730 различных образцах исследуемого материала, полученных от птиц. Общий белок сыворотки крови у животных определяли рефрактометрически на рефрактометре ИРФ 454 Б, белковые фракции -экспресс-методом (по С.Л. Карпюк, 1962), содержание тилозина в мясе птиц - микробиологическим методом (Ю.В. Кожин, 1986).

Содержание аминокислот в гидролизатах белых и красных мышц цыплят определяли с помощью автоматического анализатора аминокислот Т-339. Определение минеральных веществ в приготовленных образцах проб мяса тушек цыплят проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре С 112 и на пламенном фотометре фирмы ZEISS JENA.

Биологическую ценность белковых компонентов исследуемых продуктов мяса птиц определяли по показателю коэффициента эффективности белка (по А.А. Покровскому, 1975).

С целью изучения мясной продуктивности и ветеринарно-санитарных показателей качества мяса при включении в рационы птиц биологически активных препаратов, их убивали, определяли выход мяса и внутренних органов, выполняли органолептические исследования по ГОСТу 7269-79 (внешний вид, цвет, консистенция, запах, состояние жира и сухожилий, прозрачность и аромат бульона). В мышечной ткани определяли количество белка (по Кьельдалю, ГОСТ 26889-86), жира (методом экстрагирования в аппарате Сокслета, ГОСТ 23042-86), воды (по ГОСТу 9793-74), сухих, минеральных веществ и калорийность по общепринятым методам (В.А.Макаров и др., 1987). Доброкачественность мяса определяли методами, рекомендованными ГОСТами 7269-79, 23392-78, Правилами ветсанэкспертизы, которые включают бактериоскопию мазков-отпечатков, определение количества летучих жирных кислот, продуктов первичного распада белков. Физико-химическими методами определяли степень обескровливания (арбитражным методом по И.С.Загаевскому, 1960), рН (потенциометрическим методом), активность фермента мышечной ткани пероксидазы (В.А.Макаров и др., 1987).

Санитарно-гигиенических показателей подкожного и внутреннего жира подопытных птиц определяли по ГОСТу 8285-74 , альдегиды по Крейсу и Видману.

Количественные показатели результатов исследований подвергали вариационно-статистическому анализу с помощью программы Microsoft Excel. Достоверность устанавливали по методу Стьюдента-Фишера (Ш.А. Плохинский, 1970).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Модифицированный метод качественного и количественного определения антибиотиков группы макролидов в продуктах убоа пттиц

После проведения множества сравнительных определений чувствительности различных тест-культур: *S. lutea* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* L₂, *B. micoides* 537 и *B. micoides* НВ выбор наш был остановлен на споровой бактериальной тест-культуре *B. subtilis* ATCC 6633, которая, кроме хорошей чувствительности к препаратам тилозина, оказалась также и высокочувствительной к препаратам стрептомицина, пенициллина, неоветина и к другим антибиотикам.

Для наиболее полного извлечения антибиотиков из гомогенатов органов и тканей нами использовался метод ферментативного гидролиза раствором цитратно-солянокислого пепсина. Исследуемый материал брали в количестве 3-5 г, помещали в фарфоровую ступку, измельчали ножницами, добавляли 2%-ный раствор цитратно-солянокислого пепсина (из расчета на 1 г исследуемого материала 1 мл экстрагента). Ферментативный гидролиз проводили при комнатной температуре в течение 3-5 минут при тщательном растирании исследуемого материала с кварцевым песком. Окончание гидролиза устанавливалось по приобретении гомогенатом однообразной желеподобной консистенции.

Тилозин определяли в надосадочной жидкости гидролизата. Для этого гомогенат подвергали центрифугированию на центрифуге ЦЛР-1 или ЦЛН-2 при 5-5,5 тыс. об/мин в течение 30 минут. Определение тилозина нами проводилось тест-культурой *B. subtilis* ATCC 6633. Она более чувствительна к тилозину, образует четко выраженные зоны задержки роста, очень удобна в применении и хранении. Ее можно хранить в запаянных ампулах в виде взвесей спор в дистиллированной воде. При необходимости культуру легко можно очистить от банальной микрофлоры прогреванием в водяной бане до 65-70°C.

Доза тест-культуры для посева на питательный агар нами рассчитана опытным путем, на 80-100 мл агара должно быть 1,5-2,0 мл взвеси, содержащей 10 млн. спор *B. subtilis* ATCC 6633 в 1 мл (соответствует 10 ЕД стандарта мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Взвесь спор нами вносилась при температуре среды 65°C в 100 мл конические колбы, содержащие расплавленный стерильный агар, изготовленный на рыбьем гидролизате (рН 7,2-7,4). Нами установлено, что применение однослойной питательной среды, по сравнению с двухслойной, не оказывало каких-либо существенных влияний на результаты исследований. Засеянные тест-культурой чашки Петри с питательной средой можно готовить впрок. Для того, чтобы споры не прорастали, приготовленные среды можно хранить (7-11 суток) в холодильнике при температуре 4°C и по мере необходимости использовать.

Для определения тилозина нами применялся метод лунок. В толще Угаровой пластинки чашек Петри стерильным пробочным сверлом (0,7 мм)

вырезали по трафарету 6 лунок. Исследуемая надосадочная жидкость микропипеткой вносилась по 0,05 мл от каждой пробы в 3 лунки, а и остальные 3 лунки 3-5 чашек Петри, в зависимости от смены партии среды, вносились контрольные концентрации растворов антибиотика или же вносилась надосадочная жидкость от других исследуемых органов или тканей. После этого для инкубации чашки помещали на 10-12 ч в термостат с температурой 37°C. Нами установлено, этого времени вполне достаточно, чтобы антибиотик полностью диффундировал в агар, споры проросли в вегетативные формы бактерий и образовались четкие зоны задержки роста.

Расчет концентраций тилозина в исследованных органах и тканях нами проводился по заранее построенной стандартной кривой в ЕД/мл или мкг/г.

Использование предложенного метода определения тилозина в мясе птиц позволяет сократить время посевов и их инкубации, а в конечном итоге и продолжительность исследований с 16-20 ч до 10-12. Этим методом удается обнаружить тилан, фармазин и фразидин до 0,02 мкг/г, что свидетельствует о высокой его чувствительности. К тому же данная методика относительно не трудоемка, не требует специального оборудования и может быть выполнима в любой практической лаборатории. Ее использование дает экономию питательных сред за счет применения однослойного агара вместо рекомендуемого 2-х слойного (экономится 5 мл питательного агара на каждое исследование) и экономию времени в исследованиях на 6-8 ч.

Распределение и выведение тилозина из органов и тканей кур

Результатами наших исследований установлено, что уже через час после поступления в организм птиц с водой тилозин содержался /в концентрации от 0,73 до 10,74 мкг/г / во всех исследованных органах и тканях, причем наивысшее его количество обнаруживалось в легких птиц, где он с помощью ферментативного извлечения нами выявлялся, в довольно высокой концентрации от 1,10 до 43,8 мкг/г. В достаточно высокой концентрации / 1,53 - 3,71 мкг/г / антибиотик содержался в тканях бедренных мышц, почках, печени и коже цыплят. В данных органах и тканях /кроме бедренных мышц /тилозин навывлялся от следов препарата до концентрации 13,44 мкг/г. При этом содержание гликогена составляло в грудных мышцах $513,05 \pm 112,88$ мг% , в бедренных - $607,38 \pm 180,66$ мг% , в печени - $4607,52 \pm 243,41$ мг%.

У птиц, убитых через 24 часа остатки антибиотика нами обнаружены /от следов до 1,28 мкг/г/ во внутренних органах и у одной из трех цыплят /в 2-х лунках, из 3-х исследованных/ - слабые следы в бедренных мышцах, но отсутствовал в жировых отложениях и грудных мышцах.

При исследовании органов и тканей птиц в более отдаленные сроки остаточные количества тилозина находили только во внутренних органах. Он постоянно, в концентрации от 0,23 до 0,61 мкг/г обнаруживался в легких и костном мозге бедренных костей. Через 360 часов следы

антибиотика были найдены в легких и через 432 часа - 0,05 мкг/г в костном мозге, а в последующее время в этих органах тилозин отсутствовал. При этом необходимо отметить, что с учетом присутствия /у контрольных птиц/ естественных ингибиторов неизвестной этиологии в костном мозге бедренных костей нами при описании полученных данных на 432 час исследований внесены соответствующие коррективы. В сердечной мышце остатки тилозина обнаруживали -лишь в течение первых 24 часов, а в печени и почках - в течение 144 часов после получения птицей препарата. Исследование грудных, бедренных мышц и кожи мы производили у птиц до 192 часов. При этом в 7 исследованиях за период от 24 до 192 часов антибиотик не был обнаружен, и поэтому в более отдаленные сроки после дачи препарата тилозина его наличие не определяли.

Как установлено нашими исследованиями, в мясе и коже, т.е. наиболее ценных съедобных частях тушки, через сутки тилозин не содержится, и следовательно такое мясо как пищевой продукт не представляет для потребителя опасности, однако антибиотик продолжал сохраняться в легких и костном мозге /до 15 -18 суток/.

Таким образом, нами получены более полные данные о распределении антибиотика, и сроках его выведения из различных органов и тканей птиц. Они имеют определенное прикладное значение, так как, основываясь на этих данных, можно более рационально решать вопрос использования продуктов убоя птиц, получавших антибиотики из группы макролидов.

Нами установлено, что в органах и тканях птиц, полученных сразу же по окончании аэрозольной обработки, наивысшая концентрация тилозина выявлялось в легочной ткани /7,50 мкг/г / и менее - в костном мозге бедренных костей /6,85 мкг/г /. Обнаружение нами высоких концентраций антибиотика так быстро в данных органах, по-видимому, можно объяснить тем, что ингаляционно, поступающие лекарственные вещества в легкие, очень быстро всасываются в кровь и разносятся по всему организму, а некоторые препараты действуют мгновенно.

Во всех других органах и тканях, на момент исследований, кроме сердца, тилозин концентрировался стабильно/от 0,59 до 0,98 мкг/г /, причем содержание его в бедренных мышцах /0,98 мкг/г / было выше, чем в печени и почках /0,73 и 0,64 мкг/г /. В сердце тилозин выявлялся только в виде следов препарата. Обнаружение нами антибиотика лишь в виде следов в сердечной мышце, по-видимому, связано с высоким обменом веществ в ней во время проведения аэрозольной обработки птиц.

При исследовании птиц, убитых через 192 часа, остатки тилозина были найдены в тканях легких, печени и селезенки. В почках остатки препарата выявлялись в одной из трех исследованных лунок от следов антибиотика до слабых его концентраций /следы ~ 0,37мкг/г/. При этом устойчивое содержание остатков тилозина /0,13 мкг/г/ сохранялось в костном мозге бедренных костей птиц /данный показатель нами приводится с учетом естественной ингибиции/. В грудных, бедренных

мышцах, сердце и коже птиц антибиотик отсутствовал.

Таким образом, ингаляционная аэрозольная лечебно-профилактическая обработка птиц фармазином способствовал манным образом накоплению тилозина и довольно продолжительному его сохранению /до 192 часов -срок наблюдения/, во внутренних органах (легкие, печень и почки), а грудные, бедренные мышцы и кожа тушек птиц после прекращения применения препарата через 24 часа, становятся свободными от антибиотика.

Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса птиц при содержании остаточных количеств тилозина

Мясо птиц, содержащее остатки тилозина, достоверно отличалось от мяса контрольных птиц /свободных от антибиотиков/ по концентрации водородных ионов /рН/.

В белых мышцах птиц, содержащих тилозин в концентрации от 0,7 до 2,3 /1,77/ мкг/г, через 1,5-3 часа после убоя количество водородных ионов составляло $6,05 \pm 0,03$ / $p < 0,001$ /, через 24 часа - $5,92 \pm 0,02$ / $p < 0,02$ /; в красных мышцах, содержащих антибиотик в количестве от 1,2 до 3,8 /2,2/ мкг/г, через 1,5-3 часа после убоя рН составляло $6,38 \pm 0,03$ / $p < 0,001$ /, через 24 часа - $6,39 \pm 0,05$ / $p < 0,001$ /. Величина рН экстракта белых мышц, не содержащих тилозина через 1,5-3 часа после убоя составляло $5,90 \pm 0,04$, через 24 часа - $5,84 \pm 0,03$; красных мышц соответственно - $6,23 \pm 0,02$ и $6,18 \pm 0,04$.

Таблица 1

Физико-химические показатели мяса кур, получавших антибиотик

Показатели	Мышцы птиц					
	Исследова но проб	Опытных тушек		Исследова но проб	Контрольных тушек	
		Красные М±m	Белые М±m		Красные М±m	Белые М±m
рН через 1,5-3 часа	22	$6,38^* \pm 0,03$	$6,05^* \pm 0,03$	14	$6,23 \pm 0,02$	$5,90 \pm 0,04$
рН через 24 часа	22	$6,39^* \pm 0,05$	$5,92^* \pm 0,02$	14	$6,18 \pm 0,04$	$5,84 \pm 0,03$
Амино-аммиачный азот (мг NaOH)	22	$2,48 \pm 0,09$	$3,25^* \pm 0,09$	14	$2,52 \pm 0,06$	$3,50 \pm 0,07$
Коэффициент кислотность- окисляемости	22	$0,39 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,04$	14	$0,37 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,01$
Реакция на пероксидазу	22	+ - ± 11	+ - ± 11	14	+ - ± 7	+ - ± 7
Реакция с сернокислой медью в бульоне	22	9 2	11	14	7	7
Содержание аммиака и солей аммония	22	11	11	14	7	7

Примечание: + положительная реакция - отрицательная реакция, ± сомнительная реакция. Звездочкой (*) обозначены достоверные различия по сравнению с контролем ($P < 0,02 + P < 0,001$).

Таким образом, концентрация ионов водорода мышечной ткани кур, содержащей тилозин, значительно выше, что может быть обусловлено или прижизненной гликогенсберегающей функцией антибиотика или послеубойного его влиянием на интенсивность процесса гликолиза.

При исследовании нами, через 1,5-3 часа после убоя в показаниях коэффициента кислотности-окисляемости достоверной разницы между мясом опытных и контрольных птиц не отмечено.

При микроскопии мазков - отпечатков с поверхностных и глубоких слоев мышечной ткани цыплят от 2-х контрольных тушек /с поверхностных слоев грудных и бедренных мышц/ в поле зрения микроскопа наблюдались единичные микроорганизмы, в опытных же тушках вовсе их не выявляли. По органолептическим показателям мясо опытных птиц не отличалось от мяса контрольных.

Влияние остаточных количеств тилозина на интегральный скор суммарных белков мяса птиц

Данные наших исследований представлены в таблице 2. Из которой видно, что лимитирующей пищевую ценность мяса цыплят аминокислотой является метионин /в белках красных мышц -54,14 и белых -59,23/. Индекс пищевой ценности белка красных и белых мышц цыплят, содержащих остаточные количества тилозина, является минимальным для валила /83,66 и 94,28/, а максимальным для лизина /в белых мышцах -164,69 и в красных -148,42/. Все остальные аминокислоты приближаются к значению идеальных шкал гипотетического белка.

Таблица 2

Аминокислотные скоры суммарных белков мяса кур
при содержании тилозина, %

Аминокислоты	Мышцы птиц			
	красные		Белые	
	Тушки			
	опытные	контрольные	опытные	контрольные
Изолицин	97,15	107,30	112,25	121,37
Лейцин	104,53	91,64	113,06	86,51
Лизин	148,42	148,73	164,69	152,85
Фенилалонин	-	-	-	-
Тиразин	109,42	120,95	121,22	125,35
Метионин	54,14	68,11	59,23	71,46
Треонин	105,57	107,82	119,60	120,57
Валин	83,66	88,66	94,28	102,34

Следует отметить, полученные нами данные интегрального скоры суммарных белков мяса цыплят, содержащих остаточные количества тилозина, свидетельствуют о значительном снижении пищевой ценности данного продукта по ряду имеющих важное значение аминокислотам /метионину в мясе птиц и др./, но на ряду с этим, некоторые важные

аминокислотные показатели /лизин в белках белых и лейцин в красных и белых мышцах/ указывают, что такое мясо /о содержанием в нем остатком биологически активных веществ/ может не только уступать, а иногда даже значительно по отдельным компонентам аминокислот и превалировать нормальные продукты питания животного происхождения /свободных от антибиотиков/, что чрезвычайно важно для ветсанэкспертизы и это явление при оценки пищевой ценности мяса, содержащих антибиотики /при идентификации от нормальных продуктов/ необходимо учитывать.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что остаточные количества тилозина, находящиеся в мясе птиц, вызывая дисбаланс важных аминокислотных компонентов белков мяса /метионина, лизина и др./ и приводит к значительному снижению питательной ценности такого продукта.

Степень инактивации остаточных количеств тилозина в мясе птиц при хранении в замороженном состоянии

В процессе хранения при воздействии холодом /-6-8°C/ в различные сроки тилозин в органах и тканях птиц полностью не инактивируется.

После 15 суток хранения в 5-ти исследованных нами пробах белых мышц происходила полная инактивация антибиотика, в то время как в красных мышцах обнаруживались следы тилозина. Через 20 суток и после месячного хранения в белых и красных мышцах обнаруживались следы антибиотика. В образцах проб белых и красных мышц цыплят полностью тилозин не разрушался даже при хранении более 10-ти месяцев. При этом необходимо отметить, что после 15 суток хранения в печени птиц инактивация тилозина нами не выявлена.

Следует отметить, естественные ингибирующие вещества выявлены нами также в костном мозге /бедренных костей/ птиц, концентрация в котором составляет $0,56 \pm 0,06$ мкг/г. В связи с этим, в определенных случаях, по-видимому, не исключается возможность взаимодействия остатков тилозина и естественных ингибиторов организма.

Таким образом, продолжительное хранение мяса птиц, содержащего остаточные количества тилозина в замороженном состоянии при -6 -8°C в различные сроки, не способствует полному разрушению в нем антибиотика. Напротив, в некоторых органах и тканях цыплят наблюдается накопление биологически активных веществ, выявляемые микробиологическим методом диффузии в агар, что, по-видимому, объясняется биохимическими ферментативными процессами, возникающими в период хранения и десорбцией тилозина, связанного с белковыми компонентами организма.

Степень инактивации тилозина в мясе птиц при различной продолжительности варки

В процессе варки мяса птиц в течение 1 часа тилозин разрушался полностью в красных мышцах и при 1,5 часовой термической обработке - в костном мозге. Однако при варке 1,5 часа в красных мышцах антибиотик обнаруживался в виде следов.

Аналогичная картина накопления препарата нами выявлена в костном мозге после варки в течение 1 часа, а у цыплят, получавших до убоя препарат фармазина 600 мг на птицу - в печени. При этом необходимо отметить, депонирование антибиотика в тканях печени происходило в большей концентрации после варки в течение 1 часа, чем по сравнению с термической обработкой 1,5 часа. В мясном бульоне во всех исследованных образцах содержание антибиотика регистрировалось в основном от концентрации 0,8 до 1,55 мкг/г/мл/, а в 1-ой исследованной нами пробе обнаруживалось до 4 мкг/г /мл/. Накапливание в некоторых органах и тканях тилозина, по-видимому, объясняется переходом определенной концентрации антибиотика в процессе варки из мясного бульона в указанные выше органы и ткани. Полученные нами результаты показывают, что при варке мяса цыплят содержащего остатки тилозина в течение 1,5 часов в некоторых органах и тканях /в почках, сердце, костном мозге, коже птиц и др./ инактивация антибиотика происходила в большей степени, чем при варке в течение 1 часа, однако полная инактивация остаточных количеств тилозина /тилана и фармазина/ при этом в исследованных нами органах и тканях не отмечалась.

Таким образом, термическая обработка различной продолжительности при максимальном содержании в органах и тканях тилозина не способствует полному разрушению остаточных количеств препарата в мясе птиц, по-видимому, данные температурные режимы не позволяют расщепить полностью белковые молекулы тилозина, в связи с достаточно высокой устойчивостью его химических связей. Напротив, благодаря разной полярности органов и тканей, в печени и в некоторой степени в костном мозге, происходит депонирование антибиотика, что, очевидно, связано с переходом в процессе варки определённой концентрации препарата из мясного бульона в названные ткани и органы.

Степень инактивации тилозина в мясе через 48 часов после получения птицей препаратов антибиотика при варке в течение 1 часа

Для более рационального и безвредного для здоровья потребителя использования мяса нами проведены исследования по выяснению степени инактивации тилозина в более отдаленные сроки после получения птицей макролидных антибиотиков. Полученные нами результаты представлены в таблице 3, из которой видно, что в процессе варки мяса остатки тилозина могут сохраняться во внутренних органах, в то время как наиболее ценные

в съедобном отношении части тушек кур /мышечная ткань, кожа, сердце / полностью свободны от антибиотика.

Таблица 3

Степень инактивации тилозина в органах и тканях через 48 часов после получения птицей препаратов антибиотика при варке в течении 1 часа

Исследованные органы и ткани	Количество проб	Содержание антибиотиков мкг/г		Процент инактивации
		Сырое мясо	Вареное мясо	
1	2	3	4	5
Доза тилана 135 мг на птицу.				
Белые мышцы	10	0	0	-
Красные мышцы	10	0	0	-
Кожа	9	0	0	-
Сердце	10	0	0	-
Почки	10	0,37	Сл.	Сл
Печень	10	0,56	0,13	76,79
Легкие	10	0,40	0,09	77,50
Костный мозг*	9	0,54	0,18	66,67
Бульон	4	-	0,55 в 1 пробе в 1 следы	
Доза фармазина 600 мг на птицу				
Белые мышцы	5	0	0	-
Красные мышцы	5	0	0	-
Кожа	5	0	0	-
Сердце	5	0	0	-
Печень	5	Сл.	Сл./слаб/	Сл./слаб/
Почки	4	-	Сл./слаб/	Сл./слаб/
Легкие	5	0,24	0	100
Костный мозг*	3	-	0	100
Бульон	2	-	0	100

Примечание: *концентрация тилозина приводится без учета естественной ингибиции, которая составляет (по нашим данным) $0,56 \pm 0,06$ мкг/г

Из 6-ти исследованных проб мясного бульона /в группе, получавших 135 мг тилана на птицу/ в одной пробе обнаружено остаточное содержание тилозина до 0,55 мкг/г/мл/, а в другой - следы антибиотика. Однако в группе получавших 600 мг фармазина на птицу остатки тилозина в бульоне нами не обнаружены.

По органолептическим данным, кислотному и перекисному числу состояние куриного жира опытных проб, в процессе хранения при температуре $-6-8^{\circ}\text{C}$, в течение 2 -х месяцев было в пределах нормы.

Химический состав и калорийность мяса птиц через 48 часов после получения антибиотиков группы макролидов показаны в таблице 5.

Таблица 5

Химический состав и калорийность мяса кур, получавших антибиотики

Показатели	Мышцы					
	Исследование проб	Красные М±m	Белые М±m	Исследование проб	Красные М±m	Белые М±m
		Опытных тушек			Контрольных тушек	
Белок %	20	16,53*±0,52	18,83±0,72	16	14,53±0,83	19,62±0,62
Жир %	20	3,23±0,41	2,83±0,41	16	4,04±0,64	2,50±0,34
Мин.вещества %	20	5,45±0,50	6,11±0,51	16	5,97±0,68	5,18±0,41
Влага %	20	74,78*±0,21	72,23±0,36	16	75,46±0,29	72,69±0,16
Сухое вещество	20	25,21*±0,21	27,77±0,36	16	24,54± 0,29	27,31±0,16
Калорийность Ккал/100г продукта	20	120,19±2,63	128,58±2,13	16	121,60±2,88	124,98±2,10

Примечание: Звездочкой обозначено достоверное различие по сравнению с контролем $P < 0,05$.

Как видно из таблицы, в красных мышцах опытных тушек птиц под влиянием препаратов тилозина содержание влаги достоверно уменьшается, а количество сухого вещества увеличивается. Соответственно, при этом в пробах данного мяса отмечается статистически достоверное повышение содержания протеина по сравнению с контролем. Различий в энергетической ценности между опытными и контрольными пробами мяса птиц нами не установлено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что препараты тилозина в определенной степени повышают питательную ценность мяса и в некоторой степени влияют на сохранность такого продукта. Такое мясо по санитарному качеству как пищевой продукт, по-видимому, не представляет для потребителя опасности.

Влияние остаточных количеств тилозина в мясе птиц на возникновение аллергических реакций

Из предварительных исследований проведенных нами /кожных скарификаций/ с несколькими растворами аллергенов тилозина на мышках и на крысах, получены характерные аллергические реакции немедленного типа. Однако, следует отметить, реакция у мышей на исследуемый антибиотик была более выражена, чем у крыс.

Через 3-5 минут, после скарификации методом проведения царапин

растворов 5 ЕД и 500 ЕД тилозина, у 2-ой мышки наблюдалась своеобразная анафилактическая реакция, выразившаяся в сильном угнетении общего состояния организма. У животного отмечались частые чихания, голова мышки периодически находилась как бы в опущенном положении - и состоянии вроде бы сонливости, глазки у нее временами были и полузакрытом состоянии. Мышка становилась малоподвижной, на внешние раздражители /шум, укол иглой, и др / реагировала очень слабо. На месте скарификации указанных растворов тилозина отмечалась местная реакция а виде незначительного повышения местной температуры, покраснения /гиперемии/ и небольшой отечности, при пальпации данного участка кожи у мышки проявлялась болезненность. По истечении 30-45 минут происходило улучшение в клиническом состоянии организма животного, мышка иногда притрагивалась к корму, пила воду, а через 1 час свободно принимала корм и воду, хорошо реагировала на внешние раздражители.

Таким образом становится очевидным, что препараты тилозина являются сильными алергенами, т.к. они способны вызывать тяжелые анафилактические реакция у лабораторных животных даже без предварительной их сенсибилизации.

Влияние мяса кур, получавших до убоя тилозин, на токсичность и биологическая ценность белковых компонентов пищи

За период исследований в течение 53 дней нами установлено, что длительное скармливание лабораторным животным различных компонентов мяса птиц, получавших тилозин, после проварки 1 час не приводит к каким-либо существенным изменениям в состоянии здоровья животных. Токсических явлений у животных в период проведения экспериментов нами не выявлены.

Поедаемость, проваренных компонентов мяса птиц и мясного бульона у лабораторных животных во всех группах была высокой.

Нами установлено, что при длительном /53 дня/ кормлении все группы экспериментальных животных, кроме крыс, получавших мясной бульон, достоверно прибавили в массе: первая опытная группа крыс, получавшая мышечную ткань и кожу птиц, в которых тилозин не обнаруживался - на 35,68 г /22% /; вторая опытная группа животных, получавшая в рационе внутренние органы /легкие, печень, почки/ и костный мозг кур, содержащие антибиотик от следов препарата до концентрации 0,6 мкг/г - на 45,70 г /39,57% /, в то время как контрольные крысы увеличили свой вес только - на 21,89 г /11,88%/ ($p < 0,05$).

В третьей опытной группе животных, которым скармливали мясной бульон, содержащее от следов до 0,37 ЕД/мл тилозина, отмечался небольшой отвес в весе, у крыс на 3,14 г /-1,55%/ ($p < 0,001$).

За время проведения экспериментов при наблюдении за клиническим состоянием животных отличий между опытными и контрольными

группами нами не установлено. После убоя паталогоанатомических изменений у лабораторных крыс нами не выявлены.

Коэффициенты эффективности белков, полученные в опытах на белых крысах при продолжительном /53 дня/ включении в рационы их кормления различных исследуемых компонентов мяса птицы, составили: у контрольных животных, получавших все виды исследуемого материала свободного от антибиотиков - 0,49 г/1 г белка; получавших мышечную ткань и кожу птиц, в которых тилозин не выявлялся - 0,80 г/1 г белка; получавших внутренние органы /легкие, печень, почки/ и костный мозг, содержащие антибиотики от следов до концентрации 0,6 мкг/г - 1,03 г/1 г белка, а у крыс, получавших мясной бульон, содержащий от следов до 0,37 ЕД/мл тилозина /в группе где регистрировался незначительный отвес в pese у животных на 3,14г/ КЭБ составил /с отрицательным показателем/ - 0,071 г/1 г белка.

Положительные влияния на организм растущих лабораторных животных внутренних органов /легкие, печень, почки/ и костного мозга, мышечной ткани и кожи кур и высокие величины эффективности исследованных белков, а также другие данные, которые получены нами при изучении хронической токсичности различных белковых компонентов мяса птиц, получавших за 48 часов до убоя тилозин, позволяют констатировать о достаточно высокой биологической ценности исследованных мясопродуктов, и безопасности их для здоровья потребителя.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально обоснована целесообразность применения микробиологического метода определения антибиотиков группы макролидов с применением тест-культуры *Bac. subtilis* ATCC 6633, в зависимости от цели исследований, как для количественного, так и качественного обнаружения наличия остатков тилозина и его аналогов в продуктах убоя птиц.

2. Ферментативный гидролиз позволяет практически полностью извлекать из биологического материала антибиотики в их активной форме. Препараты тилозина обнаруживаются в количестве 1,3-11,3 раза больше, чем без ферментативного гидролиза. Данный микробиологический метод высокочувствителен (0,02 мкг/г), относительно нетрудоемок и может быть выполнен в практической лаборатории.

3. Остаточные количества антибиотиков группы макролидов в мясе птиц способствуют накоплению неполноценных и образованию дефицита незаменимых аминокислот, снижают биологическую ценность и качество мясопродукта, который при употреблении в пищу может представлять опасность для здоровья человека.

4. Продолжительное хранение при температуре (-6-8°C) различные сроки в морозильной камере бытового холодильника мяса птиц,

полному разрушению в нем антибиотика.

5. Антибиотики группы макролидов в основном накапливаются и длительное время сохраняются во внутренних органах (легких, печени и почках) птиц. Бульон и паренхиматозные органы вызывают у лабораторных животных небольшое снижение (от 0,22 до 0,28) альбумино-глобулинового индекса и поэтому использование их в качестве пищевого продукта представляют потенциальную угрозу для здоровья потребителей.

6. Для более рационального использования в пищу мяса кур считается необходимым ограничить срок выдержки кур перед убоем с 5 суток до 2 суток, но при условии, что птиц после убоя необходимо разделять методом полного потрошения обязательным удалением из тушек легких, печени и почек, а наиболее ценные в пищевом отношении части тушек мышечную ткань и кожу использовать без ограничения.

7. Биологически проверенные белковые компоненты мяса птиц на лабораторных животных в исследованных дозировках обеспечивают 10 кратную пороговую безопасность при максимально допустимом суточном потреблении данных продуктов питания для человека со средней массой тела 70 кг.

8. При массовом убое птиц целесообразно осуществлять сбор удаленных внутренних органов для использования их в переработке в мясную или мясо-костную муку /от каждой 1000 птиц предполагается выход мясной муки 39,82 кг/. Сокращение на 3 суток сроков выдержки птиц, получавших с водой препараты тилозина, перед убоем предполагает значительную экономию комбикормов, расходуемых на их содержание /345 кг на 1000 - 140 дневного возраста птиц/. При этом экономический эффект в расчете на 1000 птиц составляет 5296,50 рублей, а экономическая эффективность на рубль затрат -0,33 рубля.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. На основании проведенных исследований нами предложен модифицированный микробиологический метод для количественных и качественных определений наличия остатков антибиотиков группы макролидов в продуктах убоя кур. При этом рекомендуем исследовать только легкие и печень. При выявлении в одном или обоих указанных образцах органов достаточно четко выраженных зон ингибирования в диаметре не менее 7,5 мм - результат является положительным. Определенная, таким образом, концентрация тилозина в легких или печени птиц будет соответствовать количеству препарата от следов до 0,25 мкг/г, а при обнаружении больше указанной зоны задержки роста тест культуры *B. subtilis* ATCC 6633 в исследованных тканях органов будет содержаться более высокая концентрация антибиотиков.

2. Научные разработки используются в учебном процессе по эпизоотологии и ветеринарно - санитарной экспертизе ФГОУ ВПО

"Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.О. Баумана".

3. Результаты исследований дают направление для использования антибиотиков при производстве кормовых добавок для сельскохозяйственных животных.

Список основных опубликованных работ по теме диссертации:

1. Кожевников Е.М., Кожин Ю.В. Распределение и выведение тилозина из органов и тканей кур//Диагностика и терапия незаразных болезней с.-х. животных. Сборник научных трудов. -Воронеж, ВСХИ, 1986.-С. 64-69.

2 Кожин Ю.В. Микробиологический метод определения тилозина в мясе птиц // Инф. листок № 24-86 Воронежского межотрасл. территориальн. центра НТИП. - Воронеж, 1986. - 4 с.

3. Кожин Ю.В. Повышение безопасности труда на предприятиях мясной и молочной промышленности Госагропрома СССР. Тезисы докладов. Орёл, ВНИИ охраны труда Госагропрома СССР, 1987, С. 80-81.

4. Кожин Ю.В. Безопасность труда при производстве и переработке продукции животноводства. Орёл, ВНИИОТ при Государственной комиссии Совета Министров СССР по продовольствию и закупкам, 1989, С. 106-112.

5. Кожин Ю.В. Качество и ветеринарно-санитарная оценка мяса птиц с остаточным количеством антибиотиков группы макролидов // Инф. листок № 38-89 Орловского межотраслевого территориального центра НТИП. -Орёл, 1989,-3с.

6. Кожин Ю.В. Процессы гликолиза в мышечной ткани (мясе) кур, содержащей тилозин // Инф. листок № 142-89 Орловского межотрасл. территориальн. центра НТИП. - Орёл, 1989. - 2 с.

7. Кожин Ю.В. Степень инактивации остаточных количеств тилозина в мясе птиц после воздействия холодом и кулинарной обработки // Инф. листок № 155-89 Орловского межотраслевого территориального центра НТИП. -Орёл, 1989.-4 с.

8. Кожин Ю.В. Химический состав и энергетическая ценность мяса тушек цыплят, получавших тилозин // Инф. листок № 123-89 Орловского межотраслевого территориального центра НТИП. - Орёл, 1989. -3с.

9. Кожевников Е.М., Павликов Н.В., Кожин Ю.В. Определение антибиотиков в мясе и молоке //Методические указания. -Воронеж, 1989.-11с.

10. Кожин Ю.В., Волков А.Х. Определение биологической безвредности мяса кур, получавших тилозин //Ученые записки КГАВМ. - Казань, 2004. Т. 180. - С. 59-68.

Заказ № 3 .Формат 60x84 ¹/₁₆. Тираж 100экз.
Центр информационных технологий КГАВМ
им. Н.Э. Баумана. Казань- 420074

BT.



1861

10-01-73