

12. Fry, P.R., Thakur, S., Abley, M., & Gebreyes, W.A. (2012). Antimicrobial resistance, toxinotype, and genotypic profiling of *Clostridium difficile* isolates of swine origin. *J Clin Microbiol.*, 50, 2366-2372.
13. Keel, K., Brazier, J. S., Post, K. W., Weese, S., Songer, J. G. (2007). Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol*, 45, 1963-1964.
14. Lebrun, M., Filee, P., Mousset, B., Desmecht, D., Galleni, M., Mainil, J.G., et al. (2007). The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Vet. Microbiol.*, 120, 151-157.
15. Hammitt M.C., Bueschel D.M., Keel M. K., Glock R.D., Cuneo P., DeYoung D. W., et al. (2008). A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Vet Microbiol.*, 127, 343-352.
16. Al Saif, N., & Brazier, J.S. (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol.*, 45(2), 133-7.
17. Borriello, S.P, Wren, B.W, Hyde, S., Seddon, S.V., Sibbons, P., Krishna, M.M., et al. (1992). Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect Immun.*, 60 (10), 4192-9.
18. Stubbs, S., Rupnik, M., Gilbert, M., Brazier, J., Duerden, B., & Popoff, M. (2000). Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *EMS Microbiol. Lett.*, 186, 307-312.
19. Koene, M.G.J., Mevius, D., Wagenaar, J. A., Harmanus, C., Hensgens, M.P.M., Meetsma, A.M., et al. (2012). *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect.*, 18, 778-784.

УДК 619:614.31:615.33:637.54

ГАРКАВЕНКО Т.О., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: bac@vetlabresearch.gov.ua

АЗИРКІНА І.М., e-mail: microb_antib@ukr.net

КИЇВСЬКА Г.В., канд. вет. наук, e-mail: vcheny.secretar@gmail.com

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ЩОДО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ В ПРОДУКЦІЇ ПТАХІВНИЦТВА

В статті наведено аналіз вітчизняних та європейських мікробіологічних скринінг-методів щодо визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів. Проведений порівняльний аналіз критеріїв та етапів досліджень щодо визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів європейськими скринінг-методами, а також згідно вітчизняних ДСТУ, які найближчим часом будуть впроваджені в лабораторну практику.

Визначено місце мікробіологічного методу «NAT-screening», який дозволяє досліджувати велику кількість проб, вимагає мінімальну кількість часу та розхідних матеріалів і забезпечує ідентифікацію залишкових кількостей антимікробних препаратів до групи.

Ключові слова: антимікробні препарати, мікробіологічні скринінг-методи, м'ясо птиці, яйця, NAT-screening, тест-культура мікроорганізму.

Вступ. Введена в країнах ЄС з 2006 року заборона на застосування кормових антибіотиків у субтерапевтичних дозах для стимулювання росту тварин призвела до значного збільшення використання антибіотиків у терапевтичних цілях, оскільки зросла кількість бактеріальних захворювань серед молодняку сільськогосподарських тварин та птиці [1–4].

Забезпечення безпеки здоров'я населення у значній мірі залежить від безпечності продуктів харчування. Актуальною проблемою сьогодні залишається ефективний контроль якості харчових продуктів. Одним з основних показників, які характеризують безпечність продукції птахівництва, є відсутність або присутність у концентраціях, нижчих за допустимі норми, залишків антимікробних препаратів. Важливість контролю продукції тваринництва за цим показником обумовлена тим, що антибіотики, потрапляючи через харчовий ланцюг до організму людини, можуть викликати дисбактеріоз, токсикоз, алергічні прояви, порушення мінерального обміну, накопичуватися в кістковій тканині, особливо в молодій, проліферуючій тощо [2–4]. Присутність антибіотиків та сульфаніламідів у продукції птахівництва знижує їх якість, а також ускладнює проведення мікробіологічних досліджень при їх ветеринарно-санітарній оцінці. Окрім цього, негативним наслідком споживання продукції птахівництва з надлишковим вмістом антибіотиків є розвиток антибіотикорезистентної мікрофлори у людини, що у подальшому призводить до послаблення загальної резистентності людського організму до різних патогенних агентів бактеріальної етіології, а відтак до зниження ефективності антибіотикотерапії в гуманній медицині [1, 5–7].

Методи інгибування антимікробних препаратів визнані найкращими методами дослідження. Принцип дифузійного методу полягає в здатності антимікробних речовин дифундувати в поживне середовище, інокульоване тест-мікроорганізмом, і спричиняти зони пригнічення росту чутливих до них тест-мікроорганізмів. Діаметр цих зон прямо пропорційний логарифму антибіотика у межах його концентрацій. Цей метод є достатньо об'єктивним, ґрунтується на використанні референс-штамів мікроорганізмів проти антибіотиків. Згідно з цим принципом, в ЄС розроблено багато тест-методів по визначенню антимікробних препаратів [5, 8].

Мета нашої роботи полягала у порівняльному аналізі національних та європейських мікробіологічних скринінг-методів щодо визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів у м'ясі птиці та яйцях.

Матеріали та методи досліджень. Проводили аналіз національних та європейських мікробіологічних скринінг-методів стосовно залишкової кількості антибактеріальних препаратів у продуктах птахівництва нормативно-законодавчої бази та доступних літературних джерел.

Результати досліджень та їх обговорення В нашій країні у птахівництві використовують антимікробні препарати, які поділяються на 9 груп: β -лактами, фторхінолони, тетрацикліни, поліміксини, лінкозаміди, похідні тіамфеніколу, макроліди, аміноглікозиди, плевромутиліни. Також у виробництві застосовують сульфамідні препарати та харчову добавку (авіламіцин) [8, 9].

На даний час в рамках періодичного контролю продукції птахівництва мікробіологічним методом визначають лише залишкові кількості антибіотиків тетрациклінової групи, м'ясо птиці додатково контролюють – антибіотики на наявність залишків цинкбацитрацину, а в яйцях та яєчних продуктах визначають залишки стрептоміцину [11].

З вересня 2016 року, в зв'язку з набуттям чинності Наказу «Про затвердження Параметрів безпечності м'яса птиці» від 06.08.2013 р. №695, розширюються критерії дослідження продукції птахівництва в рамках періодичного контролю на залишкові кількості антибіотиків. Так, продукцію слід буде контролювати на такі групи антибактеріальних препаратів: β -лактами, тетрацикліни, макроліди, аміноглікозиди, фторхінолони, амфеніколи, поліміксини, лінкозаміди, похідні тіамфеніколу, плевромутиліни, сульфамідні препарати та харчову добавку (авіламіцин), тому постає завдання – розробити та впровадити в лабораторну практику чутливі, прості, недорогі, рутинні скринінгові методи. До таких методів можна віднести мікробіологічні.

В 1980 р. в ЄС був запропонований загальний мікробіологічний скринінг-метод «EU-for plate method» (Bogaerts & Wolf, 1980). Цей метод включав в себе дослідження на 4 чашках Петрі із різними показниками рН твердого (щільного) поживного середовища та різними тест-культурами мікроорганізмів, а саме *Bacillus subtilis* BGA (ATCC 6633), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 за новою назвою *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (Tang & Gillevet, 2003). Скринінг-метод здійснюється шляхом нанесенням на поверхню поживного агарового середовища невеликих шматочків м'яса або нирок. Але в 1990 році, в зв'язку з появою офіційних процедур з визначення мінімально допустимих рівнів для харчових продуктів тваринного походження, було з'ясовано, що «EU-for plate method» (ЕС, 1990) за своєю чутливістю не може забезпечити виявлення залишкових кількостей антимікробних препаратів на рівні встановлених МДР. На заміну було запропоновано інші скринінг-методи дифузії в агар «Calderon, Gonzalez, Diez, & Berenguer, 1996»; «Ferrini, Mannoni, & Aureli, 2006»; «Gaudin et al., 2004»; «Myllyniemi et al., 2001»; «Okerman et al., 2001». Проте недоліком цих методів лишається те, що вони не забезпечують потрібної альтернативи, оскільки є трудомісткими за пробопідготовкою [10, 12, 13].

Більш вдалою практичною альтернативою став скринінг-метод «New Dutch kidney test (NDKT)». З 1988 року NDKT був законодавчо запропонований для визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів для проведення моніторингу в Нідерландах. Скринінг-метод включав проведення дослідження на одній чашці Петрі з щільним поживним середовищем та тест-культурою *Bacillus subtilis* BGA (ATCC 6633), а також та з використанням паперових дисків, просочених нирковою рідиною, в якій, як правило, кумулюється велика концентрація залишків антимікробних препаратів в організмі (Nouws, 1981). Проте нещодавно доведено, що NDKT також не здатний забезпечити виявлення антимікробних препаратів на рівні мінімально допустимому рівні (МДР) [12, 14].

Зараз вдосконалено та розроблено новий скринінговий мікробіологічний метод щодо визначення залишкової кількості антимікробних препаратів у продукції тваринного походження – це «A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening)».

«NAT-screening»-тест був валідований та затверджений відповідно до 2002/657/EC [15, 16] та акредитований за Dutch Accreditation Council в ISO 17025. З березня 2004 року «NAT-screening» замінює NDKT метод при проведенні досліджень відповідно до плану державного моніторингу, згідно до Council Directive 96/23/EC (1996) [10, 12, 13, 17]. Чутливість цього методу відповідає МДР нормативних документів ЄС та дає можливість визначати антибіотики 6 груп та сульфаніламідні препарати [14]. Метод розроблений за аналогією NDKT, в якості матриці для дослідження використовують ниркову рідину та рідину зразка для дослідження. Цей метод п'ятичашковий, заснований на принципі дифузії в агар антимікробних препаратів. До того ж цей метод дозволяє досліджувати велику кількість проб, вимагає мінімальну кількість часу та розхідних матеріалів. Додатковою перевагою є те, що «NAT-screening» забезпечує ідентифікацію залишкових кількостей антимікробних препаратів до групи, тим самим полегшуючи підтвердження методом рідинної хроматографії [10, 12, 13].

На даний час українські лабораторії в своїй роботі використовують Методичні вказівки №3049–84 від 1984 р. Трудомісткий, складний метод, що займає багато часу на готування проб та проведення дослідження, а головне, що чутливість методу не відповідає європейським вимогам. Готування проб проводиться в такі етапи: гомогенізація м'яса або прогрівання яєць (відновлення яєчного меланжу), зважування, додавання відповідного буферного розчину, інкубація в термостаті та прогрівання у водяній бані, центрифугування; розведення буферним розчином супернатанту; розведення стандартних розчинів антибіотиків. На кожне дослідження потрібно 2 або 4 чашки Петрі з поживним середовищем, куди внесена відповідна тест-культура, потім роблять по 6 луночок, куди розміщують по 50 мкл стандартного розчину відповідного антибіотика та супернатант, в іншу чашку – антибіотик та розведений супернатант. Висіви інкубують в термостаті.

В Україні ж найближчим часом вступають у дію два ДСТУ, які будуть передбачати використання скринінг-методів за мікробіологічного дослідження дослідженні продукції тваринництва на залишкову кількість антимікробних препаратів. ДСТУ «Продукти тваринного походження. Мікробіологічний метод визначення антимікробних речовин» дає можливість визначити присутність антимікробних речовин, таких як пеніциліни, аміноглікозиди, макроліди, сульфаніламідні, тетрацикліни, фторхінолони, енрофлоксацини і флюмеквіни: ДСТУ «Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Метод визначення антибіотиків в м'ясі та субпродуктах» встановлює метод визначення антибіотиків пеніциліну, лінкоміцину, цефалексину, стрептоміцину, хлортетрацикліну, еритроміцину, ципрофлоксацину, сульфаметазину в свіжому

та замороженому м'яси, використовуючи при цьому принцип дифузії антимікробної речовини в агар. Ці скринінг-методи розроблені на основі нормативних документів ЄС чашковим методом дифузії в агар.

Дані аналізу щодо переліку антимікробних препаратів, дослідження на які можна провести, використовуючи мікробіологічний метод у продукції птахівництва за різними нормативними документами наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Порівняння мікробіологічних методів визначення у продукції птахівництва

Антибіотики			Чутливість методу, мг/кг		
Назва	Методи		NAT-screening	нові ДСТУ	МВ 3049–84
	Нові ДСТУ	NAT-screening			
β-лактами					
Амоксицилін		Амоксицилін	0,075	–	–
Бензилпеніцилін	Пеніциліни	Пеніциліни	0,04	0,01	0,01
		Ампіцилін	0,05	–	–
		Клоксацилін	1,5	–	–
		Діклоксацилін	1,5	–	–
		Оксацилін	0,2	–	–
		Нафцилін	0,06	–	–
Фторхінолони					
Енрофлоксацин	Енрофлоксацин	Енрофлоксацин	0,05	0,1	–
Норфлоксацин			–	–	–
Флюмеквін	Флюмеквін	Флюмеквін	0,15	0,1	–
Данофлоксацин		Данофлоксацин	–	–	–
	Ципрофлоксацин		–	0,1	–
		Марбофлоксацин	0,5	–	–
		Діфлоксацин	0,1	–	–
		Оксолінова кислота	0,15	–	–
Тетрацикліни					
Доксициклін		Доксициклін	0,05	–	–
Хлортетрациклін	Хлортетрациклін	Хлортетрациклін	0,05	0,5	–
Окситетрациклін		Окситетрациклін	0,075	–	–
		Тетрациклін	0,075	–	0,01
Полімексини					
Колістин			–	–	–
Лінкозаміди					
Лінкоміцин	Лінкоміцин	Лінкоміцин	0,7	0,5	–
Похідні гіамфеніколу					
Флуорфенікол			–	–	–

(продовження таблиці 1)

Макроліди					
Тилозин		Тилозин	0,4	–	–
Тилмікозин		Тилмікозин	0,3	–	–
Спіраміцин		Спіраміцин	0,4	–	–
	Еритроміцин	Еритроміцин	0,15	0,5	–
		Джозаміцин	0,4	–	–
		Вальнемілін	0,3	–	–
		Пірліміцин	0,3	–	–
Аміноглікозиди					
Гентаміцин		Гентаміцин	0,05	–	–
Неоміцин		Неоміцин	0,1	–	–
Канаміцин		Канаміцин	0,4	–	–
Спектиноміцин			–	–	–
Апраміцин		Апраміцин	1,5	–	–
Стрептоміцин	Стрептоміцин		–	0,5	0,5
		Паромоміцин	0,3	–	–
		Дигідрострептоміцин	0,1	–	–
Плевромугіліни					
Тіамулін гідроген фумарат		Тіамулін	0,8	–	–
Сульфаніламід					
Сульфадимезин	Сульфадимезин	Сдімезоксин	0,1	0,5	–
		Смезоксазон	0,1	–	–
		Смезаксин	0,1	–	–
		Сметазин	0,1	–	–
		Сдіазин	0,1	–	–
		Спірідин	0,1	–	–
		Тріметоприм	0,05	–	–
		Бакюлоприм	0,05	–	–
Харчова добавка					
Авіламіцин			–	–	–

Дані порівняльної характеристики етапів методу досліджень «NAT-screening» та вітчизняних методів визначення антимікробних препаратів наведені в табл. 2.

Згідно з даних таблиці 2 видно, що пробопідготовка по європейських та національних стандартах має різницю в тому, що згідно ДСТУ на поверхню поживного середовища накладають диски з шматків м'яса. В кожній чашці роблять 6 отворів діаметром 8 мм по 6 шт. Згідно ж скринінг-методу «NAT-screening» на поживне середовище в луночки, заповнені буфером, викладають паперові диски, просочені рідиною проби. Також відрізняється діаметр (14 мм) та кількість (9) луночок.

Порівняльний аналіз етапів досліджень мікробіологічних методів щодо визначення залишків антимікробних препаратів

Національні методи				«NAT-screening»			
Готування проб							
<p>Відбирають проби свіжого м'яса або виймають проби м'яса з морозильника за кілька хвилин перед дослідженням і кладуть їх на неіржавіючий сталевий піднос.</p> <p>Поверхню м'яса вирівнюють скальпелем, стерильним коркобором виймають з кожної проби циліндричні виїмки діаметром 8 мм і довжиною 2 см, знімають м'ясо і за допомогою ланцета вирізають з кожної проби по 8 кружків завтовшки в 2 мм.</p> <p>Користуючись пінцетом, накладають по 2 диски один навпроти одного в кожну з шести тестових чашок у місця, де попередньо зроблені виїмки діаметром 8 мм і довжиною 2 мм.</p> <p>На кожній із 6 пластин можна розмістити до 6 дисків, що відповідають 3 досліджуваним пробам. Диски повинні утворювати коло з відстанню приблизно 1 см від краю чашки.</p>				<p>Відбирають проби свіжого м'яса або виймають проби м'яса з морозильника за кілька хвилин перед дослідженням і кладуть їх на неіржавіючий сталевий піднос.</p> <p>Якщо багато м'ясного соку в розмороженому м'ясі, то беруть сік. Поверхню м'яса вирівнюють та роблять надрізи скальпелем. Для підвищення абсорбції тканинної рідини фільтрувальний папір діаметром 12,7 мм просочують через надрізи поверхні перед тим, як їх дістануть з м'яса. Диски всмоктують приблизно 100 мкл рідини.</p> <p>В кожній чашці роблять по 9 луночок діаметром 14 мм. Користуючись пінцетом, накладають по 2 диски на одну пробу один навпроти одного в кожну з п'яти тестових чашок у місця, де попередньо зроблені виїмки та залитий буферний розчин до границі луночки, (відповідний до кожної групи антибіотиків).</p> <p>Яйця: беруть жовток (не прогривають у водяній бані).</p> <p>Яєчний порошок: розводять для того, щоб інгібувати натуральні інгібітори. Так само, як і для м'яса, готують чашки для дослідження яєць.</p>			
Діюча речовина	Буферні розчини	Тест-культура	Поживне середовище	Діюча речовина	Буферні розчини	Тест-культура	Поживне середовище
β-лактами							
Пеніцилін ^{1,2}	Фосфатний буферний розчин рН 8,0+ метанол для розведення стандарту	Vac. subtilis ATCC 6633	Поживне середовище для визначення пеніциліну рН 6,0	Амоксицилін Пеніциліни Ампіцилін Клоксацилін Діклоксацилін Оксацилін Нафцилін	200 μl 1,5 M b.f. рН 8,0 для проб	Micr. luteus ATCC 9341	ISO-Sensitest Agar рН 8,0 (2mm)

(продовження таблиці 2)

Фторхінолони							
Енрофлоксацин ¹	Фосфатний буферний розчин рН 8,0+1М NaOH для розведення стандарту	Escherichia coli ATCC 11303	Поживне середовище для визначення фторхінолонів рН 8,0				
Флюомек-він ¹	Фосфатний буферний розчин рН 8,0+метанол для розведення стандарту	Escherichia coli ATCC 11303	Поживне середовище для визначення фторхінолонів рН 6,0	Енрофлоксацин Данофлоксацин Флюомеквін Оксолінова кислота Марбофлоксацин Діфлоксацин	200 µl 0,1 М b.f. рН 6,5 для проб	Yersinia ruckeri NCIM 13282 (ATCC 29473)	Plate Count Agar рН 6,5 (2,5 mm)
Ципрофлоксацин ²	1М NaOH для розведення стандарту	Escherichia coli ATCC 11303	Поживне середовище для визначення фторхінолонів рН 8,0				
Тетрацикліни							
Хлор-тетрациклін ^{1,2}	Фосфатний буферний розчин рН 8,0+0,1М NaOH для розведення стандарту	Bac. cereus ATCC 11778	Поживне середовище для визначення тетрациклінів рН 6,0	Доксициклін Хлортетрациклін Окситетрациклін Тетрациклін	200 µl 0,1 М b.f. рН 6.0+CA Р 2µg/l для проб	Bac. cereus ATCC 11778	ISO-Sensitest Agar рН 6.0+CAP 625µg/l (2,5 mm)
Лінкозаміди							
Лінко-міцин ²	1М NaOH для розведення стандарту	Bac. subtilis ATCC 6633	Поживне середовище для визначення лінкозамідів рН 8,0	Лінкоміцин	200 µl 1,5 М b.f. рН 8,0 для проб	Micr. luteus ATCC 9341	ISO-Sensitest Agar рН 8,0 (2mm)

(продовження таблиці 2)

Макроліди							
Еритроміцин ₁	Фосфатний буферний розчин рН 8,0+ метанол для розведення стандарту	Micr. luteus ATCC 9341	Поживне середовище для визначення макролідів рН 8,0	Тилозин Тилмікозин Вальнемілін Еритроміцин Спіраміцин Джозаміцин Пірліміцин	200 µl 1,5 М b.f. рН 8,0 для проб	Micr. luteus ATCC 9341	ISO-Sensitest Agar рН 8,0 (2mm)
Еритро-міцин ₂	Метанол для розведення стандарту						
Аміноглікозиди							
Стрептоміцин _{1,2}	Фосфатний буферний розчин рН 8,0+ метанол для розведення стандарту	Vac. subtilis ATCC 6633	Поживне середовище для визначення аміноглікозидів рН 8,0	Неоміцин Апраміцин Гентаміцин Канаміцин Дигідрострептоміцин Пароміцин	200 µl 0,1 М Tris bufor рН 8,5 для проб	Vac. subtilis ATCC 6633	Plate Count Agar рН 8,0 (2,5 mm)
		Vac. Mycoi-des ATCC 537	Поживне середовище для визначення аміноглікозидів рН 8,0				
Плевромугіліни							
				Тіамулін	200 µl 1,5 М b.f. рН 8,0 для проб	Micr. luteus ATCC 9341	ISO-Sensitest Agar рН 8,0 (2mm)
Цефалоспори́ни							
Цефалексин	1М NaOH для розведення стандарту	Vac. subtilis ATCC 6633	Поживне середовище для визначення цефалоспоринів рН 8,0	Цефалексин Цефкюіном Цефпірін Цефтіофур	200 µl 0,1 М Tris bufor рН 8,5 для проб	Vac. subtilis ATCC 6633	Plate Count Agar рН 8,0 (2,5 mm)

(продовження таблиці 2)

Сульфанілами́ди							
Сульфадимезин ^{1,2}	Фосфатний буферний розчин рН 8,0+ 2N NaOH для розведення стандарту	Vas. subtilis ATCC 6633	Поживне середовище для визначення сульфаніламідів рН 7,2	Сдімезоксин Смезоксазол Смезаксин Сдіазін Триметоприм Бакюлоприм	300 µl 0,133 M b.f. рН 8,0	Bacillus pumilus CN 607	DST Agar рН 7,0+ TMP 625µg/I
	1M NaOH для розведення стандарту		Поживне середовище для визначення сульфаніламідів рН 7,2				

Примітки: 1. ДСТУ «Продукти тваринного походження. Мікробіологічний метод визначення антимікробних речовин»;

2. ДСТУ «Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Метод визначення антибіотиків в м'ясі та субпродуктах».

Аналізуючи буферні розчини, що використовуються для дослідження, виявлено, що українські скринінг-методи передбачають їх застосування для розведення антибіотиків, а «NAT-screening» – як для дослідження проб, так і для розведення стандартів антибіотиків.

Потрібно відмітити, що поживні середовища у всіх мікробіологічних скринінг-методах майже однакові за складом. Особливе значення в дослідженнях має рН-показник, який залежно від культури (антибіотика) різниться. В переважній більшості рН-показник поживного середовища для визначення аналогічних антимікробних препаратів співпадають в європейських та в національних методах. Проте показник рН поживного середовища значно відрізняється при визначенні залишкових кількостей пеніциліну. Так, в українському скринінг-методі він становить 6,0, а в «NAT-screening» – 8,0. Така ж ситуація і при визначенні залишкових кількостей енрофлосацину, де для поживного середовища згідно ДСТУ показник рН 8,0 а в «NAT-screening» методі – 6,0.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. В Україні за допомогою мікробіологічного методу в продукції птахівництва визначають лише залишкові кількості антибіотиків тетрациклінової групи, цинкбацитрацин та стрептоміцин. Який за своєю чутливістю не відповідає сучасним європейським вимогам.

2. Сучасні українські ДСТУ розроблені на основі мікробіологічних скринінг-методів ЕС мають переваги та передбачають виявлення залишкових кількостей 10 антимікробних препаратів: β-лактами (пеніцилін), фторхінолони

(енрофлосацин, флюмеквін, ципрофлоксацин), тетрацикліни (хлортетрациклін), лінкозаміди (лінкоміцин), аміноглікозиди (стрептоміцин), макроліди (еритроміцин), цефалоспорини (цефалексин), антибіотики та сульфаніламідні (сульфадимезин). Проте цей перелік не охоплює всі антимікробні препарати, залишкові кількості яких необхідно буде контролювати згідно чинного законодавства (наказ від 6.08.2013 р. №695).

3. Метод «NAT-screening» виявився найефективнішим та дає можливість дослідити залишкові кількості 43 антибіотиків, які відносять до шести груп, та сульфаніламідні препарати.

Необхідно валідувати та впровадити нові мікробіологічні скринінг-методи – як національні, так і «NAT-screening» метод.

Після чого необхідно впровадити їх у лабораторну практику мікробіологічні скринінг-методи, які визначають залишкові кількості наступних антибіотиків: норфлосацину, колістину, спектиноміцину та флуолфеніколу. Тому потрібно працювати над розробкою нових методів досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коцюмбас І. Я. Проблеми використання антимікробних препаратів для стимулювання росту продуктивних тварин та альтернативи їх застосуванню / І. Я. Коцюмбас, В. М. Гунчак, Т. І. Стецько // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – 2013. – Вип. 14 – № 3–4. – С. 381–389.

2. O'Brien T. F. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally / T. F. O'Brien // Clin. Infect. Diseases. – 1997.–V. 24, № 1. – P. 2–8.

3. Гуфрій Д. Використання антибіотиків у тваринництві – порятунок чи поява нової проблеми при прогресуючому зростанні опірності мікроорганізмів проти них / Д. Гуфрій // Ветеринарна медицина України. – 2000. – №8. – С. 20–22.

4. Постников С. С. Токсические эффекты антибиотиков / С. С. Постников. – Москва, 2006. – С.–115.

5. Музыка В. П. Скринінг-метод визначення залишків антимікробних препаратів у тушах тварин [Електронний ресурс] / [В. П. Музыка, Т.І. Стецько, Л. О. Святоцька та ін.] – Режим доступу: <http://www.inenbiol.com/ntb/ntb3/pdf/3/4.pdf>.

6. Кальницкая О.И. Проблемные аспекты использования антибиотиков в ветеринарии и животноводстве / О.И. Кальницкая // Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве: Материалы международной научно-практической конференции. – Чебоксары. – 2004. – С. 4–8.

7. Косенко М. Проблема антибіотикорезистентності у ветеринарній медицині / [М. Косенко, В. Музыка, О Чайковська, та ін.] – Ветеринарна медицина України. – 2005. – №1. – С. 38–39.

8. Косенко Ю.М. Перспективи застосування нових антимікробних препаратів у птахівництві [Електронний ресурс] / Ю.М. Косенко, І.К. Авдосьєва, В.П. Музыка, Н.В. Остапів, І.Л. Мельничук, В.В. Регенчук, С.М. Темненко, О.Б. Басараб. – Режим доступу: <http://www.inenbiol.com/ntb/ntb4/pdf/5/2.pdf>.

9. ДВФСУ «Зареєстровані ветеринарні препарати, кормових добавок, готових кормів та преміксів». – Режим доступу: <http://www.vet.gov.ua/node/888>.

10. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT – screening) [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

11. Наказ Державного департаменту ветеринарної медицини №87 від 18.11.2003 року «Обов'язковий мінімальний перелік досліджень сировини, продукції тваринного та рослинного походження, комбікормової сировини, комбікормів, вітамінізованих препаратів та ін., які слід проводити в державних лабораторіях ветеринарної медицини». [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://document.ua/obovjakovii-minimalnii-perelik-doslidzhen-sirovini-produkciju-nor8259.html>.

12. Gondova Zuzana. The NAT test – screening for antibiotic residues in the tissues of food-producing animals / Zuzana Gondova, Ivona Kozarova.//Institute of Meat Hygiene and Technology University of Veterinary Medicine and Pharmacy Kosice, Slovak Republic. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.maso-international.cz/download/maso-international-2012-2-page-095-100.pdf>.

13. Nico COPPENS. Microbial screening tests for antibiotic residues in meat: compared with the European technologies / Ghent university veterinary faculty [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/893/681/RUG01-001893681_2012_0001_AC.pdf.

14. Commission Regulation (EU) № 37/2010 // Official journal of the European Commission. – 2010. – L 15. – P 72.

15. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Commission, L 221, P 8–28.

16. Pikkemaat M.G.: Nouws antibiotic test: Validation of a post-screening method for antibiotic residues in kidney. / [M.G. Pikkemaat, S. Oostra-Van Dijk, J. Schouten] HJ 2009 Food Control 20: 771–777. TOTAL ANTIBIOTICS: Instruction manual. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.biomedica.co.at>

17. Директива Совета 96/23/ЕЕС от 29 апреля 1996 года, о мерах по контролю отдельных веществ и их остаточного содержания в не забитых животных и продуктах животного происхождения, принятая в отмену действия Директив 85/358/ЕЕС и 86/469/ЕЕС и Постановлений 89/187/ЕЕС и 91/664/ЕЕС // Official Journal of the European Communities. – 1996. – L.125, 23.5.1996.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ПРОДУКЦИИ ПТИЦЕВОДСТВА / Гаркавенко Т.А., Азыркина И.М., Киевская А.В.

В статье приведен анализ отечественных и европейских микробиологических скрининг-методов по определению остаточных количеств антимикробных препаратов. Проведенный сравнительный анализ критериев и этапов исследований по определению остаточных количеств антимикробных препаратов европейскими скрининг-методами, а также украинских ДСТУ, которые в ближайшее время будут внедрены в лабораторную практику.

Определено место микробиологического метода «NAT-screening», который позволяет исследовать большое количество проб, требует минимальное количество времени и расходных материалов и обеспечивает идентификацию остаточных количеств антимикробных препаратов в группу.

Ключевые слова: антимикробные препараты, микробиологические скрининг-методы, мясо птицы, яйца, NAT-screening, тест-культура микроорганизма.

COMPARATIVE ANALYSIS OF MICROBIOLOGICAL METHODS FOR DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESIDUALS PREPARATIONS IN POULTRY PRODUCTION / Garkavenko T.A., Azyrkina I.M., Kyivska G.V.

Introduction. One of the main indicators characterizing the safety of poultry products is the absence or presence in concentrations residues of antimicrobial drugs below the permissible limits.

Methods of inhibiting antimicrobial agents are recognized as the best research methods. This method is quite objective, based on the standard strains of microorganisms susceptibility to antibiotics.

The goal of the work was the comparative analysis of the national and European microbiological screening methods for antibiotic residual in poultry meat and eggs.

Results of research and discussion. Since September 2016 in connection with the entry into force of the Order "On approval of safety parameters of poultry" from 06.08.2013. N695 criteria of studying the poultry products under the periodic control of antibiotics traces are expanded. Goal is to develop and implement to the laboratory practice sensitive, simple, cheap, readily available screening methods, such as microbiological method.

«A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening)»; was validated and approved in accordance with the 2002/657/EC and accredited by the Dutch Accreditation Council in ISO 17025. Since March 2004 method research under state monitoring plan according to Council Directive 96/23/EC. The sensitivity of this method corresponds EU MRL normative documents and makes it possible to determine the antibiotic group and 6 sulfanilamidnye drugs. This five cup method based on the principle of agar diffusion of antimicrobial agents. Method allows you to explore a large number of samples and require minimum amount of time and consumables, provides the identification of residual amounts of antimicrobial agents to the group.

Conclusions and prospects for further research:

1. Today in Ukraine using microbiological method in poultry products we can determine only residual amounts of tetracycline antibiotics group zinc bacitracin, streptomycin.
2. The method of «NAT-screening» provides an opportunity to explore the remaining number of 43 antibiotics that belong to six groups and sulfanilamides.

Keywords: Preparations antimicrobial, microbial screening method, poultry meat, eggs, NAT-screening, test microorganisms culture.

REFERENCES

1. Kotsyumbas, I.Ya., Hunchak, V.M., Stets'ko, T.I. (2013). Problemy vykorystannya antymikrobnnykh preparativ dlya stymulyuvannya rostu produktyvnykh tvaryn ta al'ternatyvy yikh zastosuvannyu [Problems of antimicrobial agents to stimulate growth of farm animals and the use of alternative]. *Naukovo-tekhnichnyy byuleten' Instytutu biolohiyi tvaryn i Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrol'noho instytutu vetpreparativ ta kormovykh dobavok – Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Biology and State research control institute of veterinary preparations and fodder supplements*, 14 (3-4), 381-389 [in Ukrainian].
2. O'Brien T. F. (1997). The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin. Infec. Diseases*, 24 (1), 2-8.
3. Hufriy, D. (2000). Vykorystannya antybiotykyv u tvarynnytstvi – poryatunok chy poyava novoyi problemy pry prohresuyuchomu zrostanni opirnosti mikroorhanizmiv proty nykh [The use of antibiotics in livestock – the salvation or the emergence of new problems in the progressive growth of microorganisms resistance against them]. *Veterynarna medytsyna Ukrayiny – Veterinary Medicine Ukraine*, 8, 20-22 [in Ukrainian].
4. Postnykov, S.S. (2006). *Toksycheskye efekty antybyotykov [Toxic effects of antibiotics]*. Moskva [in Russian].
5. Muzyka, V.P. Skryyninh-metod vyznachennya zalyshkiv antymikrobnnykh preparativ u tushakh tvaryn [Screening method for determining antimicrobial residues in carcasses of animals]. www.inenbiol.com. Retrieved from <http://www.inenbiol.com/ntb/ntb3/pdf/3/4.pdf>. [in Ukrainian].

6. Kalniczkaya, O.Y (2004). Problemnye aspekty ispolzovaniya antibiotikov v veterinarii i zhivotnovodstve [Problem aspects of the use of antibiotics are in veterinary science and stock-raising]. Proceedings of international research and practice conference: *Sostoyanie i problemy veterinarnoy sanitarii, gigieni i ekologii v zhivotnovodstve – State and problems of veterinary sanitation, hygiene and ecology in a stock-raising*. (pp.4-8). *Cheboksaries* [in Russian].
7. Kosenko, Yu.M. (2005). Problema antybiotyko rezystentnosti u veterynarniy medytsyni [The problem of antibiotic resistance in veterinary medicine]. *Veterynarna medytsyna Ukrayiny – Veterinary Medicine Ukraine*, 1, 38-39 [in Ukrainian].
8. Kosenko, Yu.M. Perspektivi zastosuvannya novikh antimikrobnikh preparativ u ptaxivnicztvi [Prospects of application of new antimicrobial preparations are in the poultry farming]. Retrieved from <http://www.inenbiol.com/ntb/ntb4/pdf/5/2.pdf> [in Ukrainian].
9. DVFSU «Zareyestrovani veterinarni preparati, kormovikh dobavok, gotovikh kormiv ta premiksiv» [DVFSU «Registered veterinary preparations, forage additions, prepared forage and premiksiv»]. www.vet.gov.ua. Retrieved from <http://www.vet.gov.ua/node/888> [in Ukrainian].
10. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT – screening). www.elsevier.com. Retrieved from <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.
11. Nakaz Derzhavnoho departamentu veterynarnoyi medytsyny №87 vid 18.11.2003 roku «Obov'yazkovyy minimal'nyy perelik doslidzhen' syrovyny, produktsiyi tvarynnoho ta roslynnoho pokhodzhennya, kombikormovoyi syrovyny, kombikormiv, vitaminizovanykh preparativ ta in., yaki slid provodyty v derzhavnykh laboratoriyakh veterynarnoyi medytsyny» [Order of the State Department of Veterinary Medicine №87 dated 18.11.2003 "Mandatory minimum list of research materials, products of animal and vegetable origin, animal feed raw materials, feed, medicines and fortified al., Which should be in public veterinary laboratories."]. document.ua. Retrieved from: <http://document.ua/obovjakovii-minimalnii-perelik-doslidzhen-sirovini-produkciy-nor8259.html> [in Ukrainian].
12. Gondova Zuzana. The NAT test – screening for antibiotic residues in the tissues of food-producing animals – *Institute of Meat Hygiene and Technology University of Veterinary Medicine and Pharmacy Kosice, Slovak Republic*. www.maso-international.cz. Retrieved from: <http://www.maso-international.cz/download/maso-international-2012-2-page-095-100.pdf>.
13. Nico COPPENS. Microbial screening tests for antibiotic residues in meat: compared with the European technologies. Ghent university veterinary faculty. [www.lib.ugent.be](http://lib.ugent.be). Retrieved from: http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/893/681/RUG01-001893681_2012_0001_AC.pdf.
14. Commission Regulation (EU) № 37/2010. (2010). *Official journal of the European Commission*, L 15.
15. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Commission*, L 221, 8–28 [in English].
16. Pikkemaat M.G. (2009). Nouws antibiotic test: Validation of a post-screening method for antibiotic residues in kidney. *HJ 2009 Food Control* 20: 771–777. *TOTAL ANTIBIOTICS: Instruction manual*. – Retrieved from: <http://www.biomedica.co.at>.
17. Direktiva soveta 96/23/EES of 29 Aprelya 1996 o merax po kontrolyu otdelnykh veshhestv y` ikh ostatochnogo sodержaniya v ne zabitykh zhivotnykh i produktakh zhivotnogo proishozhdeniya [Directive of Advice of 96/23/EES from April, 29, 1996, about measures of control of separate matters and their remaining maintenance in the not hammered zoons and products of animal origin]. (1996). *Ofitsiynyy zhurnal Yevropeys'kykh spivtovarystv – Official Journal of the European Communities* [in Russian].