

## **ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ АНТИБІОТИКІВ ТЕТРАЦИКЛІНОВОЇ ГРУПИ В ПРОДУКЦІЇ ПТАХІВНИЦТВА МІКРОБІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ**

**Т. О. Гаркавенко**, кандидат ветеринарних наук,  
старший науковий співробітник

**І. М. Азиркіна**, завідувач лабораторії  
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної  
діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

У статті наведено дані апробації та валідації методу «NAT-screening» визначення залишкової кількості антибіотиків тетрациклінової групи в продукції птахівництва мікробіологічним методом. Визначено місце мікробіологічного методу «NAT-screening», який дозволяє досліджувати велику кількість проб, потребує мінімальної кількості часу та розхідних матеріалів і забезпечує ідентифікацію залишкових кількостей антимікробних препаратів до групи.

**Ключові слова:** тест-культура *Bac. cereus* ATCC 11778, тетрациклін, окситетрациклін, хлортетрациклін, доксициклін, м'ясо птиці, яйця, NAT-screening, яєчні продукти.

**Постановка проблеми.** Введена з 2006 року у Європейському Союзі заборона на застосування кормових антибіотиків у субтерапевтичних дозах для стимулювання росту тварин призвела до значного збільшення використання антибіотиків з терапевтичною метою, оскільки зросла кількість бактеріальних захворювань серед молодняку сільськогосподарських тварин та птиці. Тому актуальною проблемою сьогодні залишається ефективний контроль продукції птахівництва на наявність залишкових кількостей антибіотиків [1, 2].

Антибіотики тетрациклінової групи належать до групи антибактеріальних препаратів широкого спектру дії. Перший антибіотик групи тетрациклінів – хлортетрациклін, виділений в 1948 р. Дугганом з плісневих грибів *Streptomyces aureofaciens* [3].

Важливість контролю залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи обумовлена тим, що потрапляючи через харчовий ланцюг до організму людини, вони можуть викликати дисбактеріоз, токсикоз, алергічні прояви, вторинні грибкові інфекції, порушення мінерального

обміну, є остеотропними, а також сприяють розвитку антибіотикорезистентної мікрофлори у людини [3, 4].

**Стан вивчення проблеми.** Залишки антимікробних препаратів у сировині та продукції тваринного походження регламентуються такими нормативними документами ЄС: Регламентом Комісії (ЄС) №37/2010, Директивою Ради №96/23/ЄЕС, САС/MRL 02, Codex Alimentarius Commission (Комісією Кодекс Аліментаріус), Commission Decision 2002/657/ЕС (Рішення Комісії 2002/657/ЕС), які гармонізують в Україні в Наказі №695 від 06. 08. 2013 р.

З березня 2004 р. в країнах ЄС з метою визначення залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи (окситетрациклін, доксициклін, тетрациклін, хлортетрациклін) використовують скринінговий мікробіологічний метод – «A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening)» [6].

«NAT-screening» був валідований та затверджений відповідно до 2002/657/ЕС та акредитований за Dutch Accreditation Council в ISO 17025. Чутливість цього методу для антибіотиків тетрациклінової групи відповідає максимально-допустимим рівням (МДР) нормативних документів ЄС (табл. 1). Перевагою даного методу є те, що забезпечується ідентифікація залишкових кількостей антимікробних препаратів до групи, тим самим полегшуючи подальше підтвердження методом рідинної хроматографії [6–10].

На даний же час в Україні в рамках періодичного контролю продукцію птахівництва мікробіологічним методом досліджують лише на залишкові кількості тетрацикліну. Проте з вересня 2016 р. 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 (таблиця 1).

Національний метод МВ 3049–84 дозволяє виявляти залишкові кількості тетрацикліну в концентрації 0,01 ОД/г [5].

**Метою статті** було провести апробацію та валідацію якісного мікробіологічного методу «NAT-screening» визначення антибіотиків тетрациклінової групи в м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах.

**Методика досліджень.** В основі мікробіологічного методу визначення антибіотиків тетрациклінової групи лежить принцип дифузії в агар, тобто здатності антибіотиків

дифундувати в щільне поживне середовище, інокульоване специфічним чутливим тест-мікроорганізмом, викликаючи затримку його росту. Це проявляється появою в агарі чітко окреслених, чистих від росту тест-культури зон [6].

Таблиця 1

**Порівняння показників та МДР антибіотиків тетрациклінової групи у продукції птахівництва за діючими нормативними документами України та ЄС**

Антибіотики тетрациклінової групи	CAC/MRL 02 Codex Alimentarius Commission, мкг/кг	Регламент Комісії (ЄС) №37/2010, мкг/кг	Обов'язковий мінімальний перелік досліджень (національне законодавство)	Наказ №695 від 06. 08. 2013 р., мкг/кг
М'ясо птиці				
Тетрациклін	100	100	Не допускається (≤0,01 ОД/г)	100
Хлортетрациклін	100	100	–	100
Доксициклін	100	100	–	100
Окситетрациклін	100	100	–	100
Яйця				
Тетрациклін	400	200	Не допускається (≤0,01 ОД/г)	–
Хлортетрациклін	400	200	–	–
Доксициклін	400	200	–	–
Окситетрациклін	400	200	–	–

*Готування тест-культури мікроорганізму та чашок з тестовим агаром*

Для дослідження використовували музейний штам спороутворюючої тест-культури *Bacillus cereus* ATCC 11778, чутливої до антибіотиків тетрациклінової групи у концентрації  $10^5$  КУО/см<sup>3</sup>. Використовували поживні середовища Мюллера-Хінтона (виробництва HIMEDIA, Індія) з рН 6,0 із додаванням хлорамфеніколу концентрації 625 мкг/дм<sup>3</sup>. Агар заливали в чашки Петрі шаром 2,5 мм.

*Стандарт антибіотика.*

Використовували стандарт «Окситетрациклін» (виробника Sigma Aldrich) – основний розчин антибіотика розводили 0,1 М розчином соляної кислоти (HCl), робочий розчин – 0,1 М фосфатним буфером рН 6,0. Розчин окситетрацикліну з активністю 0,06 мкг вносили по 100 мкл в чашки з тестовим агаром на диск з фільтрувального паперу діаметром 12,7 мм.

*Готування проб до дослідження.*

М'ясо: проби м'яса виймали з морозильника за кілька хвилин перед дослідженням, клали їх на неіржавіючий

сталевий піднос, поверхню м'яса вирівнювали та робили поперечні надрізи скальпелем, в які вкладали диски з фільтрувального паперу діаметром 12,7 мм на 30 хв з метою просочування м'ясним соком.

При дослідженні яєць відбирали жовток, яким також просочували диски фільтрувального паперу діаметром 12,7 мм.

Ячний порошок попередньо розводили дистильованою водою та прогрівали у водяній бані за температури  $65 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин. Просочували фільтрувальний диск діаметром 12,7 мм. суспензію зразка.

В кожній чашці з тестовим агаром робили по 2 лунки діаметром 14 мм, в які заливали 0,1 М фосфатний буферний розчин (рН 6,0) з хлорамфеніколом у концентрації 2 мкг/см<sup>3</sup> до границі луночки, після чого в них вкладали, користуючись пінцетом, диски, просочені соком однієї проби, один навпроти одного.

Чашки інкубували протягом 16–18 годин за температури  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Після інкубації чашки оглядали на наявність зон інгибування тест-культури *Vacillus cereus* ATCC 11778 навколо лунок.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програми «Microsoft Excel 15,0» із обчисленням середнього арифметичного (M), стандартної похибки (m) та рівня вірогідності (p) за таблицею Стьюдента. Різницю між двома величинами вважали вірогідною при  $p \leq 0,05$ ;  $\leq 0,01$ ;  $\leq 0,001$ .

Також визначали точність, специфічність, чутливість методу згідно ДСТУ ISO 16140 : 2006.

Для встановлення межі чутливості з визначення залишків антибіотиків тетрациклінової групи мікробіологічного методу «NAT-screening» було проведено на модельованих пробах м'яса птиці, яєць та яєчних продуктів: пробах м'яса, вільних від антибіотиків (негатив), та в пробах із внесеними стандартними розчинами окситетрацикліна, хлортетрацикліна, тетрацикліна, доксицикліна у концентраціях 50 мкг/кг ( $\frac{1}{2}$  МДР), 100 мкг/кг (МДР); пробах яєчних продуктів та яйцях вільних від антибіотиків та додаванням аналітів у концентраціях 100 мкг/кг ( $\frac{1}{2}$  МДР) та 200 мкг/кг (МДР) цих же антибіотиків. Дослідження проводились у 20 повторюваностях.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Провівши серію досліду, встановлено, що навколо луночок із внесеним стандартом спостерігаються чітко окреслені, чисті від росту

тест-культури *Bacillus cereus* ATCC 11778, зони інгибування, які коливаються в межах від 17,95 до 18,05 мм. Всі негативні проби не давали зони із затримкою росту навколо дисків, просочених рідиною проби, спостерігали суцільний ріст тест-культур.

В пробах продукції птахівництва, в які було внесено антибіотики тетрациклінової групи, спостерігались навколо дисків, просочених рідиною проби, чітко окреслені зони затримки росту тест-культури *Bacillus cereus* ATCC 11778. Результати щодо діаметрів зон інгибування для різних продуктів та різних антибіотиків наведені в табл. 2 та 3.

Таблиця 2

**Діаметри зон затримки росту тест-культури *Bacillus cereus* ATCC 11778 навколо проб м'яса з доба додаванням аналітів  $M \pm m$ , мм, n=20**

Концентрація антибіотика в пробах	Антибіотики тетрациклінової групи			
	Окситетрациклін	Тетрациклін	Доксициклін	Хлортетрациклін
Негативний контроль	Відсутні зони затримки росту тест-культури навколо дисків, просочених рідиною проби			
Контроль (стандарт)	18±0,05 мм			
Проба з додаванням аналіту на рівні ½ МДР	17,04±0,03*	19,03±0,02*	18,04±0,03*	18,03±0,03*
Проба з додаванням аналіту на рівні МДР	18,03±0,03*	20,03±0,03*	19,03±0,03*	19,03±0,03*

**Примітки:** \*  $p \leq 0,05$ ; різниця значень показника концентрацій антибіотика відносно негативного контролю.

Аналізуючи одержані дані, спостерігали, що зони інгибування навколо проб м'яса ½ МДР окситетрацикліну мали найнижчі зони затримки росту та становили 17,04±0,03 мм, а найвищі зони затримки росту 19,03±0,02 мм спостерігали навколо дисків, просочених рідиною проб із додаванням тетрацикліну на рівні ½ МДР.

В пробах яєць найнижчі зони затримки росту були навколо проб із додаванням хлортетрацикліну на рівні 17,03±0,02 мм, найвищі ж зони затримки росту доксицикліну 19,03±0,02 мм були навколо проб із додаванням на рівні ½ МДР.

**Діаметри зон затримки росту тест-культури *Bacillus cereus* ATCC 11778 навколо проб яєць з додаванням аналітів,  $M \pm m$ , мм,  $n=20$**

Концентрація антибіотика в пробах	Антибіотики тетрациклінової групи			
	Окситетрациклін	Тетрациклін	Доксициклін	Хлортетрациклін
Негативний контроль	Відсутні зони затримки росту тест-культури навколо дисків, просочених рідиною проби			
Контроль (стандарт)	18±0,05 мм			
Проба з додаванням аналіту на рівні ½ МДР	18,03±0,02*	18,01±0,01*	19,03±0,02*	17,03±0,02*
Проба з додаванням аналіту на рівні МДР	19,01±0,01*	20,03±0,02*	20,01±0,01*	18,01±0,01*

**Примітки:** \*  $p \leq 0,05$ ; різниця значень показника концентрацій антибіотика відносно негативного контролю.

Що ж до результатів із добавкою окситетрацикліну в пробах м'яса на рівні 1 МДР, то зони інгибування становили 18,03±0,03 мм, найвищі ж зони затримки росту були 20,03±0,03 мм та спостерігалися навколо дисків, просочених рідиною проб із додаванням тетрацикліну на рівні 1 МДР.

Проте, в пробах яєць на рівні 1 МДР найнижчі зони затримки росту 18,01±0,01 мм були навколо дисків проб із рідиною хлортетрацикліну, найвищі ж затримки росту проб із додаванням спостерігали навколо дисків просочених рідиною проб із тетрацикліном 20,03±0,02 мм та доксицикліном 20,01±0,01 мм.

Виходячи з отриманих результатів, можна зробити висновок, що найнижчий рівень визначення (½ МДР) залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи для *Bacillus cereus* ATCC 11778 за допомогою якісного мікробіологічного скринінг-методу «NAT-screening» для м'яса становить 50 мкг/кг, для яєць та яєчних продуктів – 100 мкг/кг. Специфічність, точність та чутливість даного методу була 100%.

**Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. На сьогоднішній день в Україні продукція птахівництва контролюється на залишкові кількості тетратетрацикліну, з вересня 2016 року стає обов'язковим

визначення антибіотиків тетрациклінової групи: тетрацикліну, окситетрацикліну, хлортетрацикліну, доксицикліну.

2. Встановлено, що чутливість національного мікробіологічного методу (МВ №3049 – 84) дозволяє виявляти тетрациклін в продукції птахівництва у концентрації 0,01 ОД/г.

3. Встановлено, що чутливість європейського мікробіологічного методу залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи (тетрациклін, окситетрациклін, хлортетрациклін, доксициклін) «NAT-screening» для м'яса становив 50 мкг/кг, для яєць та яєчних продуктів – 100 мкг/кг, що відповідає МДР європейського законодавства та наказу №695 від 06. 08. 2013 р.

4. Встановлено, що специфічність, точність та чутливість «NAT-screening» становить 100%.

**Перспективи подальших досліджень.** У зв'язку з розширенням критеріїв дослідження продукції птахівництва на залишкові кількості антибіотиків тетрациклінової групи у рамках періодичного контролю слід впровадити в роботу лабораторій ветеринарної медицини метод «NAT-screening».

Список використаних джерел:

1. 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.

2. 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.

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

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

5. 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-produkciy-nor8259.html>.

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

7. 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. [Электронный ресурс] – Режим доступа :<http://www.maso-international.cz/download/maso-international-2012-2-page-095-100.pdf>.

8. Nico COPPENS. Microbial screening tests for antibiotic residues in meat: compared with the European technologies / Ghent university veterinary faculty[Электронныйресурс] – Режим доступа : [http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/893/681/RUG01-001893681\\_2012\\_0001\\_AC.pdf](http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/893/681/RUG01-001893681_2012_0001_AC.pdf).

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

10. 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.

Т. А. Гаркавенко, И. М. Азыркина. **Определение остаточного количества антибиотиков тетрациклиновой группы в продукции птицеводства микробиологическим методом.**

*В статье приведены данные апробации и валидации метода определения остаточного количества антибиотиков тетрациклиновой группы в продукции птицеводства микробиологическим методом «NAT-screening». Определено место микробиологического метода «NAT-screening», который позволяет исследовать большое количество проб, требует минимального количества времени и расходных материалов и обеспечивает идентификацию остаточных количеств антимикробных препаратов группы.*

**Ключевые слова:** *тест-культура *Bac. cereus* ATCC 11778, тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин, доксициклин, мясо птицы, яйца, NAT-screening, яичные продукты.*

Т. Garkavenko, I. Azyrkina. **Determination of the residual amounts of antibiotics of the tetracycline group in poultry products microbiological methods.**

**Formulation of the problem** *A pressing problem today remains the effective control of poultry products for the availability of residual amounts of tetracycline group antibiotics, due to the fact that getting through the food chain to the human body, can cause overgrowth, toxemia, allergic reactions, secondary fungal infections, violation of mineral metabolism, is osteotropic and promote the development of antibiotic-resistant microorganisms in humans.*

**State of studying the problem** *Now in Ukraine as part of periodic monitoring of poultry with the help of microbiological method only the residual amount of tetracycline is examined. However, in September 2016 in connection with the entry into force of the Order. №695 from 08. 06. 2013,*



criteria of study of poultry products under the periodic control residual amounts of tetracycline antibiotics (oxytetracycline, doxycycline, tetracycline, chlorthalotetracycline) are expanded.

**The purpose and objectives of research** Conduct testing and validation of qualitative microbiological «NAT-screening» method, determination of tetracycline antibiotics in poultry, eggs and egg products.

**Research methodology** The basis of this method is the principle of diffusion in agar, the ability of antibiotics to diffuse to the tight nutrient media inoculated by specific sensitive test organism causing inhibition zone. This is reflected in the emergence of clearly defined agar, net growth of the test culture zones. Basically we took the microbiological screening method - «NAT-screening», which is used by the EU.

**Results and discussion** The results are treated by methods of variation statistics using the program «Microsoft Excel – 15,0» from calculating the arithmetic mean (M), standard deviation (m) and the level of probability (p) by Student's table. We determined the accuracy, specificity, sensitivity of method.

#### **Conclusions and recommendations for further research**

Established that sensitivity of European microbiological method «NAT-screening» of residual amounts of tetracycline antibiotics for meat was 50 mg / kg for eggs and egg products - 100 mg/kg, corresponding MDR European law and order №695 from 06. 08. 2013

**Prospects for further research** Due to expansion of studying criteria of poultry products to residual amounts antibiotics tetracycline group within the periodic monitoring should introduce the work of laboratories «NAT-screening».

**Keywords:** test culture *Bac. cereus* ATCC 11778, tetracycline, oxytetracycline, chlorthalotetracycline, doxycycline, poultry, eggs, NAT-screening, egg products.