

ЗАСТОСУВАННЯ СТАНДАРТИЗОВАНИХ ПІДХОДІВ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ТЕРМІНІВ ВИВЕДЕННЯ ЗАЛИШКІВ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ З ОРГАНІЗМУ ПРОДУКТИВНИХ ТВАРИН

*Д. В. Янович, д-р с.-г. наук,
І. Я. Коцюмбас, д-р вет. наук, професор, академік НААН,
З. С. Засадна, канд. біол. наук,
О. М. Паздерська, старший науковий співробітник
С. М. Кіслова, науковий співробітник
Н. А. Майба, молодший науковий співробітник*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті узагальнено досвід, одержаний Національною референсною лабораторією з контролю залишкових кількостей ветеринарних препаратів та кормових добавок ДНДКІ ветпрепаратів, при застосуванні імуноферментного методу (ІФА/ELISA) для дослідження рівнів залишків субстанцій у тканинах продуктивних сільськогосподарських тварин до безпечних рівнів, встановлених законодавством України та Європейського Союзу. Розглянуто етапи клінічних досліджень ветеринарних антимікробних лікарських засобів, що містять антибіотики групи хінолонів, які ілюструють застосування стандартизованих підходів з оцінки придатності вищезгаданих методик для цілей експерименту та розглядають критично важливі точки процесу валідації методик відповідно до критеріїв, встановлених Рішенням Єврокомісії 657/2002/ЕС та Рекомендаціями референс-лабораторій ЄС в галузі контролю залишкових кількостей 20/1/2010. Обговорюються особливості методу та аналізуються можливості їх впливу на одержані результати досліджень та статистичні підходи при проведенні обрахунків прогнозованих періодів витримки продуктивних тварин, відповідно до рекомендацій EMEA/CVMP/036/95-FINAL.

Ключові слова: ПЕРІОД ВИВЕДЕННЯ (КАРЕНЦІЯ), ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ, СТАТИСТИЧНА ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ, ЕНРОФЛОКСАЦИН, МДР.

Хінолони – велика група синтетичних антибактерійних речовин, які застосовуються у медичній практиці уже впродовж 50 років. Успіх їх використання пояснюється унікальним механізмом дії, який принципово відрізняється від інших антибактерійних засобів, що забезпечує їх ефективність проти широкого спектру штамів мікроорганізмів. Механізм бактерицидної активності базується на здатності цих сполук проникати через мембрану в мікробну клітину, де вони інгібують бактеріальні ферменти: топоізомерази II (ДНК-гірази), яка каталізує процес суперспіралізації ДНК, та топоізомерази IV, яка регулює рівень суперспіралізації. Розлади вищезгаданих ферментних систем зупиняють процеси розмноження патогенних бактерій. Описаний механізм дії забезпечує активність хінолонів, як проти грам-негативних, так і проти грам-позитивних бактерій, в яких інгібуються, відповідно, або ДНК-гірази, або топоізомерази IV. Спричинене блокування транскрипції та рекомбінації бактеріальної ДНК зупиняє розмноження бактеріальних клітин. Найбільш відомий представник групи хінолонів – енрофлосацин також викликає зміни у проникливості фосфоліпідного шару зовнішньої мембрани клітинної стінки бактерії, пригнічуючи біосинтез мікробної ДНК, суттєво не впливаючи при цьому на біохімічні процеси клітин вищих тварин.

Найчастіше у ветеринарії застосовують хіноліни II покоління, і зокрема – енрофлоксацин, який і було розроблено для застосування у ветеринарній медицині при лікуванні великої рогатої худоби, свиней, собак, котів, курчат та індиків із захворюваннями респіраторної, сечовидільної та травної систем [1]. Ветеринарні лікарські засоби на основі енрофлоксацину застосовують з 80-х років минулого століття. Протягом тривалого часу застосування вищезгаданих препаратів все частіше відмічаються випадки зниження їх ефективності, що, в свою чергу, зумовлює збільшення терапевтичних доз створених препаратів і може спричинити перевищення встановлених регуляторних максимальних рівнів МДР, залишків енрофлоксацину та його метаболіту у сировині тваринного походження. Ці залишки можуть нести значні ризики для здоров'я людей, стимулюючи розвиток бактеріальної резистентності та порушуючи мікрофлору кишкового тракту [2].

З метою зменшення ризику для здоров'я людини, законодавство Європейського Союзу встановлює максимально допустимі рівні (МДР) залишків енрофлоксацину та його метаболіту ципрофлоксацину у харчових продуктах: для м'язових тканин всіх тварин – 100 мкг/кг, для печінки – 200 мкг/кг (кури, свині, кролики) та 300 мкг/кг (ВРХ, вівці, кози); для молока – 100 мкг/кг (Розпорядження Комісії ЄС 37/2009) [3]. З цією ж метою було введено поняття періоду виведення залишків АФІ препаратів з організму тварин після завершення їх лікування до зменшення концентрації препарату та/або його метаболітів у тканинах цільових тварин, до безпечного рівня, нижчого за встановлений МДР.

Метою цієї публікації є показати основні етапи процедури визначення періоду виведення ветеринарних препаратів на основі енрофлоксацину з тканин (м'язи, печінка) курчат-бройлерів та молока корів.

Матеріали і методи. З метою встановлення періоду виведення препаратів на основі енрофлоксацину з тканин курей-бройлерів та молока ВРХ, використовували тест-набори RIDASCREEN Chinolone/Quinolones (Art. No. R3113), виробництва фірми Р-Біофарм (Німеччина). Методика призначена для кількісного визначення енрофлоксацину у зразках м'яса, яєць, риби, креветок, меду та молока тест-системою Хінолон для конкурентного імуоферментного аналізу. Тест-система містить планшет на 96 чарунок, готові до використання реактиви та стандартні зразки. Зразки молока, які зберігались до початку випробувань за умови мінус 20 °С, вносять безпосередньо у чарунки планшету відразу після розморожування, гомогенізації інтенсивним струшуванням та знежирення методом центрифугування. Зразки тканин (м'язів та печінки) попередньо гомогенізують, екстрагують аналіт розчином метанолу, розділення фаз проводять центрифугуванням та розводять буферним розчином для проведення дослідження. Межа виявлення (LOD) енрофлоксацину у молоці і тканинах складає 3 мкг/кг, межа визначення (LOQ) – 10,0 мкг/кг, що відповідає вимогам придатності методик для цілей скринінгу і за даними валідації, наданої виробником, корелює з результатами, одержаними хроматографічними методами, для діапазону концентрацій у межах невизначеності встановленого МДР для залишків енрофлоксацину у молоці і тканинах (100 мкг/кг) та печінці (300 мкг/кг) [3]. Специфічність моноклональних антитіл цього набору до енрофлоксацину та його метаболіту ципрофлоксацину – 100 %.

Здатність витягу (R, %) тест-набору вивчали за аналізу зразків молока і тканин контрольної групи тварин, яким не вводили дослідний препарат. Для збагачення зразків на рівні цільової концентрації скринінгу використали референс-стандарт енрофлоксацину (Sigma-Aldrich, Art/Product 33699, Batch SZBE199XY, 99,8 %). Для експериментального дослідження придатності тест-набору встановлено величину цільової концентрації скринінгу енрофлоксацину (концентрація, за якої скринінг-метод класифікує зразок, як скринінг-позитивний) на рівні або нижче МДР (якщо дозволяє метод – то на рівні $\frac{1}{2}$ МДР) так, як і для інших зареєстрованих препаратів. МДР енрофлоксацину для зразків молока і м'язів становить 100 мкг/кг, печінки – 300 мкг/кг, тому навантаження зразків проводили на рівні $\frac{1}{2}$ МДР – 50 та 150 мкг/кг, відповідно. Метрологічні характеристики тест-набору дозволяють визначати

аналіт у вказаних досліджуваних зразках у концентрації від 10 мкг/кг. Проте, враховуючи необхідність розширення лінійного діапазону методики, що є обов'язковою умовою кінетичних досліджень, а також враховуючи вплив досліджуваних матриць на сигнал контрольних зразків, було прийняте рішення про вибір цільових концентрацій на рівні 25 та 100 мкг/кг для м'язів та печінки, відповідно. Для визначення відсотку витягу енрофлоксацину з навантажених зразків, відібрані чисті та збагачені контрольні зразки молока і тканин готували та аналізували за методикою тест-набору.

Результати й обговорення. Для дослідження періоду виведення препаратів проводять детальну оцінку доступних методів визначення залишкових кількостей аналіту у зразках цільових тканин, розглядаючи їх метрологічні характеристики, надані виробником наборів (у випадку використання методу ІФА): специфічність набору до досліджуваного аналіту, наявність та відсоток перехресного зв'язування з можливими метаболітами, можливість виконання необхідних досліджень для цільових матриць, встановлений виробником відсоток витягу аналіту для навантажених стандартами зразків. В подальшому необхідно провести валідацію аналітичної методики згідно Рішення ЄС 657/2002 та Рекомендацій 20/1/2010 [4, 5], встановлюючи її основні параметри: відсоток витягу (R, %), межу прийняття рішення (технічний поріг) (СС α), здатності виявлення (СС β) для досліджуваних цільових зразків. Визначення відсотку витягу аналіту із зразків печінки, м'язів та молока, проводиться за критерієм “додано-одержано”, як описано вище. Результати оцінки придатності методики визначення залишків енрофлоксацину у зразках м'язів, печінки та молока наведено у таблицях 1, 2 і 3, відповідно. Одержані у цьому випадку результати підтверджують придатність вибраної методики для визначення вмісту залишків енрофлоксацину у зразках тканин курчат-бройлерів та молока корів на рівні МДР з вірогідністю одержаних даних на рівні 95 %.

Таблиця 1

Результати оцінки придатності методики визначення енрофлоксацину в зразках м'язових тканин курчат-бройлерів, (n = 20)

Контрольні зразки				Збагачені зразки на рівні 25 мкг/кг				
	OD	В/В0 (%)	Концентрація, мкг/кг		OD	В/В0 (%)	Концентрація, мкг/кг	R, %
M	0,588	44,043	43,594	M	0,456	34,189	66,287	90,772
SD	0,009	0,698	1,070	SD	0,019	1,397	4,988	20,752
M+SD*2,33	0,609	45,668	46,087	M+SD*1,64	0,487	37,444	77,910	
M-SD*2,33	0,566	42,417	41,101	M-SD*1,64	0,426	31,898	58,106	
CV%	1,584	1,584	2,454	CV%	4,086	4,086	7,526	22,862

Таблиця 2

Результати оцінки придатності методики визначення енрофлоксацину в зразках печінки курчат-бройлерів, (n = 20)

Контрольні зразки				Збагачені зразки на рівні 100 мкг/кг				
	OD	В/В0 (%)	Концентрація, мкг/кг		OD	В/В0 (%)	Концентрація, мкг/кг	R, %
M	0,529	38,420	54,761	M	0,282	20,485	160,38	105,62
SD	0,014	1,017	2,584	SD	0,012	0,874	9,991	10,060
M+SD*2,33	0,562	40,791	60,783	M+SD*1,64	0,302	22,521	183,66	
M-SD*2,33	0,496	36,050	48,739	M-SD*1,64	0,262	19,051	143,99	
CV%	2,648	2,648	4,719	CV%	4,266	4,266	6,230	9,524

Відсоток витягу залишків енрофлоксацину із навантажених зразків м'язів та печінки становив: 90,8 % та 105,6 %, відповідно, що було використано для розрахунку даних, одержаних у кінетичному експерименті. Технічний поріг методики (M+SD*2,33) у м'язах та печінці становив: 46,1 мкг/кг та 60,8 мкг/кг, відповідно. Поріг кількісного визначення енрофлоксацину (LOQ) для завдань експерименту становить: 50 мкг/кг – для зразків м'яса та

100 мкг/кг – для зразків печінки. Середні значення вмісту енрофлоксацину у зразках м'язів та печінки, збагачених аналітом на рівні 25 та 100 мкг/кг, становили: 66,28 та 160,38 мкг/кг, відповідно.

Таблиця 3

Результати оцінки придатності методики визначення енрофлоксацину в зразках молока, (n = 20)

Контрольні зразки			Збагачені зразки на рівні 50 мкг/л					
	OD	B/B0 (%)	Концентрація, мкг/л		OD	B/B0 (%)	Концентрація, мкг/л	R, %
M	1,27	73,69	0,18	M	0,79	39,93	51,29	102,58
SD	0,02	1,41	0,04	SD	0,02	1,04	1,78	3,57
M+SD*2,33	1,32	76,97	0,27	M+SD*1,64	0,83	41,64	54,21	
M-SD*2,33	1,21	70,41	0,09	M-SD*1,64	0,76	38,23	48,36	
CV%	1,91	1,91	22,61	CV%	2,6	2,6	3,48	45,93

Для зразків молока відсоток витягу методики становив 102,6 %, технічний поріг – 76,97 мкг/л, а поріг кількісного визначення енрофлоксацину для завдань експерименту – 50 мкг/л.

Оцінку, отриманих за валідації даних, проводять з урахуванням 5 % похибки β та визначенні рівня відсікання за графічним поданням здатності виявлення $CC\beta$ [6]. Для кожного результату серії досліджень контрольних зразків визначають значення сигналу відповіді В1 аналітичних реакцій, обчислюють середнє значення відповіді для серії контрольних зразків М та стандартне відхилення SD їх відповіді. В подальшому обчислюють граничне значення або «технічний поріг» Т:

$$T = M + 2,33 \times SD, \text{ де:}$$

M – середнє значення відповіді;

SD – стандартне відхилення значень контрольних зразків.

Для кожного результату серії досліджень збагачених зразків, визначають значення сигналу відповіді Y1 аналітичних реакцій. Для серії збагачених зразків обраховують середнє значення відповіді М та стандартне відхилення SD. Для методу ІФА відповідь В/В0% (відношення оптичного поглинання одержаного значення до оптичного поглинання стандартного зразка з нульовою концентрацією аналіту у відсотках) обернено-пропорційно до одержаної концентрації. Тому:

$$F_m = M - 1,64 \times SD, \text{ де:}$$

M – середнє значення відповіді;

SD – стандартне відхилення значень збагачених зразків.

На рисунках 1, 2 та 3 графічно зображено технічний поріг і лінії відсікання методики ІФА для визначення залишкових кількостей енрофлоксацину у зразках м'язових тканин, печінки та молока, відповідно.

Як видно з рисунків 1, 2, 3, між середнім значенням відповіді холостих зразків М та технічним порогом рівень помилково-позитивних результатів скринінгу більший, ніж 5 %. Відповідно до Рішення ЄС 2002/657 [4, 7], здатність виявлення вищенаведених методик відповідає критеріям, коли $CC\beta > M$.

Після підтвердження придатності вибраної методики для визначення залишкових кількостей енрофлоксацину у тканинах та молоці проводили визначення вмісту аналіту в досліджуваних зразках. Отримані у кінетичному експерименті результати перераховували відповідно до обчисленого відсотку витягу: 90,8, 105,6, 102,6 % для зразків м'язів, печінки та молока. Статистичну обробку одержаних даних проводили відповідно до рекомендацій ЕМЕА/СVMP/036/95 та ЕМЕА/СVMP/473/98 [8, 9], прогнозовані терміни періодів витримки цільових тварин обраховували за програмним забезпеченням WT 1.4 (для зразків тканин) і WTM 1.4 (для зразків молока), які передбачають використання різноманітних статистичних

тестів об'єктивної оцінки однорідності дисперсії даних. Ці програми базуються на принципах, викладених у керівництві ЕМЕА [8, 9], розроблені у Німеччині та затверджені CVMP [10].



Рис. 1. Графічне зображення технічного порогу та лінії відсікання методики ІФА для визначення залишкових кількостей енрофлоксацину у зразках м'язових тканин



Рис. 2. Графічне зображення технічного порогу та лінії відсікання методики ІФА для визначення залишкових кількостей енрофлоксацину у зразках печінки

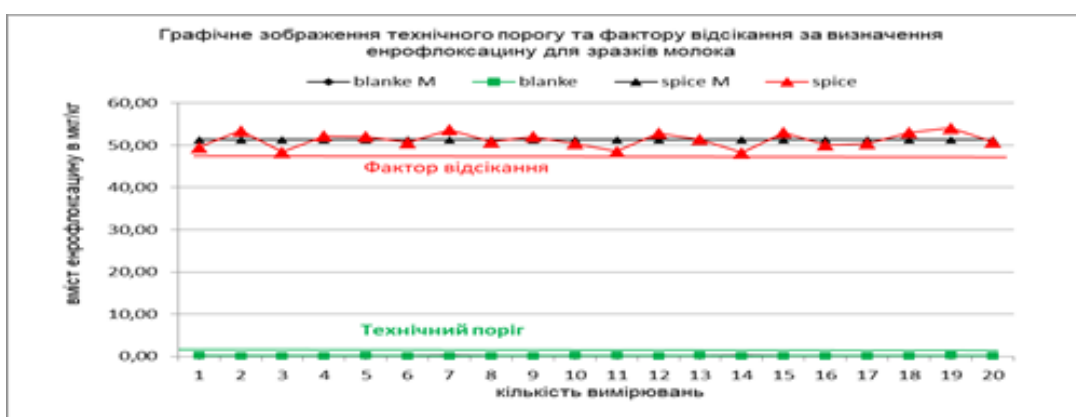


Рис. 3. Графічне зображення технічного порогу та фактору відсікання для визначення залишкових кількостей енрофлоксацину у зразках молока

За результатами визначення вмісту енрофлоксацину у зразках тканин, отриманими після їх оцінки тестом Кокрана за програмою WT 1.4, зроблено висновок щодо однорідності дисперсії даних, одержаних в експерименті. Відмінність між даними недостовірна (рис. 4), графічне зображення розподілу даних вибірки залишків енрофлоксацину наведено на рис. 5.

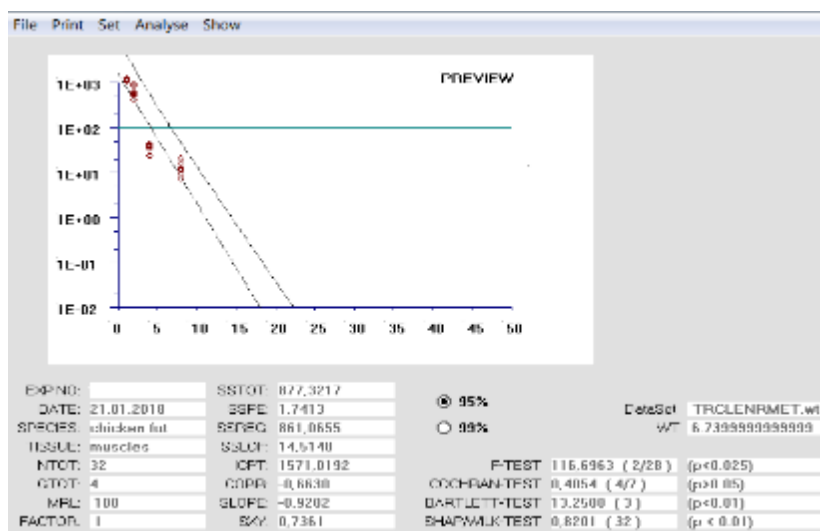


Рис. 4. Оцінка достовірності різниць у групах за аналізу дисперсії даних по залишках енрофлоксацину у зразках м'язових тканин, за тестами Фішера, Кокрана, Барлета та Шапіро

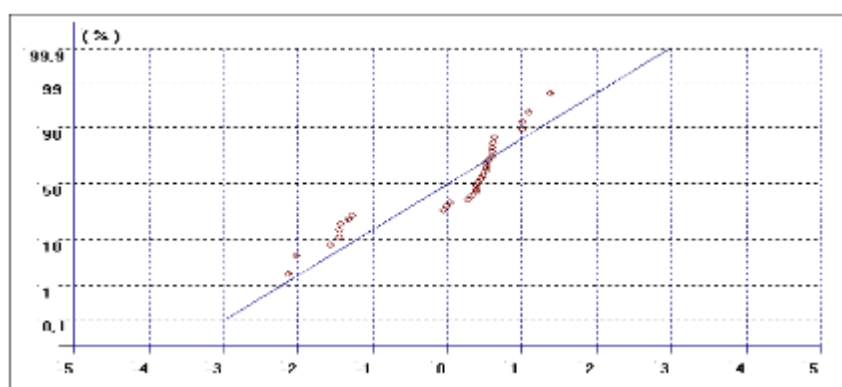


Рис. 5. Графічне подання розподілу даних вибірки за виявленим в них вмістом залишків енрофлоксацину в м'язах.

На підставі експериментальних даних та результатів їх статистичної обробки, розраховано період витримки курчат-бройлерів для забезпечення МДР для залишків енрофлоксацину у м'язових тканинах на рівні 6,74 доби. Дотримання встановленого періоду забезпечує 95 % вірогідність того, що у м'язах курчат вміст залишків енрофлоксацину не буде перевищувати значень МДР з урахуванням меж невизначеності методів його контролю.

За статистичного обрахунку даних, дослідження залишків енрофлоксацину у печінці тестами Кокрана та Барлета, одержано найбільш об'єктивні результати щодо однорідності їх дисперсії. Відмінність між даними недостовірна (рис. 6), графічне зображення розподілу даних вибірки залишків енрофлоксацину наведено на рис. 7.

На підставі експериментальних даних та результатів їх статистичної обробки, розраховано період витримки курчат-бройлерів для забезпечення МДР для залишків енрофлоксацину у печінці на рівні 6,92 доби, а згідно з рекомендаціями Настанов [10, 11], заокруглене значення становить 7,0 діб. Дотримання встановленого періоду забезпечує 95 % вірогідність того, що у печінці курчат вміст залишків енрофлоксацину не буде перевищувати значень МДР з урахуванням меж невизначеності методів його контролю.

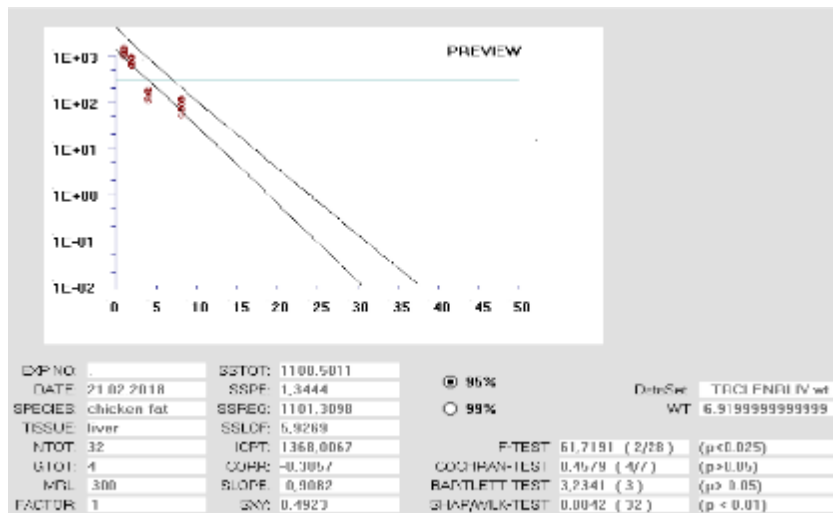


Рис. 6. Оцінка достовірності різниць у групах за аналізу дисперсії даних по залишках енрофлоксацину у зразках печінки, за тестами Фішера, Кокрана, Барлета та Шапіро

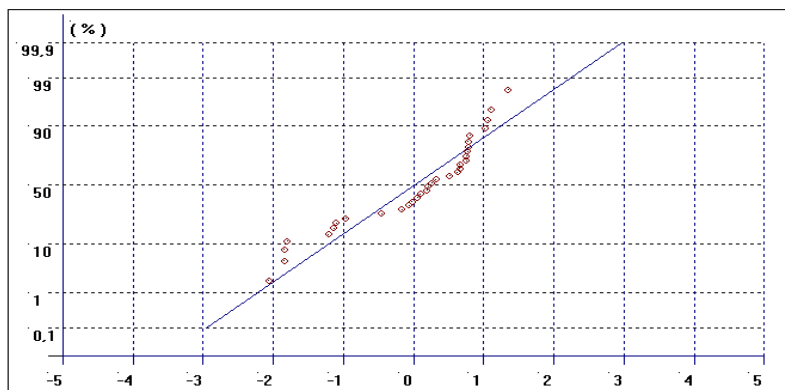


Рис. 7. Графічне подання розподілу даних вибірки за виявленим у них вмістом залишків енрофлоксацину у зразках печінки

Отже, в результаті статистичних розрахунків отримано значення періоду виведення діючої речовини ветеринарного препарату з м'язів та печінки дослідних курчат-бройлерів на рівні 7 діб. У цьому випадку період виведення з цих видів тканин практично збігається: 6,74 і 6,92 доби. Однак, опираючись на власний досвід роботи по визначенню каренції, у більшості випадків спостерігається істотна різниця у періодах виведення аналітів з різних тканин. Так, під час дослідження періоду виведення препарату на основі тилозину з тканин, концентрація аналіту в печінці досягала більш високих значень, і виводився він впродовж експерименту значно повільніше, ніж з м'язових тканин. Це говорить про те, що печінка може бути цільовою тканиною для оцінки періоду витримки у курчат-бройлерів [12].

Для статистичної оцінки експериментальних даних по вмісту аналіту у зразках молока корів використано програмне забезпечення WTM1.4, де результати графічно представлено рівнянням лінійної регресії для математичного обчислення прогнозованого терміну виведення залишків енрофлоксацину.

На рисунку 8 подано графічне представлення алгоритму обчислення TTSC, одного з основних методів визначення безпечного рівня залишків діючих речовин у молоці. З урахуванням меж невизначеності методу, який застосовувався для одержання експериментальних даних, виявлені концентрації залишків аналіту на третю добу були меншими за встановлений МДР, а на четверту добу експерименту – середнє значення рівня

залишків енрофлоксацину є меншим за межу кількісного визначення (LOQ) і наближається до межі виявлення (LOD).



Рис. 8. Графічне представлення рівняння регресії для TTSC методу та обраховане значення рекомендованого періоду витримки 4,5 доби (WT=4,47), АФІ – енрофлоксацин.

Таким чином, за результатами кінетичного експерименту ми можемо встановити період виведення енрофлоксацину з м'язових тканин курчат-бройлерів на рівні 6,74 доби, що згідно з рекомендаціями Настанов [10, 11] заокруглене до вищого значення і становить 7,0 діб. У випадку дослідження залишкових кількостей аналізу у зразках печінки курчат-бройлерів період виведення становив – 6,92 доби або 7,0 діб аналогічно до вищевказаного значення. За результатами дослідження періоду виведення енрофлоксацину зі зразків молока корів розраховано період 4,47 доби, що становить 5,0 діб.

Однак, приведені в цій статті результати досліджень періодів виведення аналітів з цільових тканин курчат-бройлерів та молока корів для окремих препаратів, не можуть бути догмою для всіх ветеринарних препаратів такого типу на основі енрофлоксацину. Оскільки сьогодні виробляють різні фармацевтичні препарати на основі цього аналізу для лікування та профілактики захворювань у різних тварин і птиці, які відрізняються фармацевтичною композицією, дозою, тривалістю лікування, способом та місцем введення. Відмінності у рецептурі та способах введення призводять до зміни фармакокінетики діючих речовин в організмі тварин, і, відповідно, змінюючи остаточну фазу – елімінацію препарату з організму, що може спричинити подовження/скорочення терміну виведення залишків діючих речовин з органів-мішеней [13]. Крім того, значний вплив на період виведення діючих речовин ветеринарних препаратів має також значення МДР, згідно з Кодексом Аліментаріус [14], встановлене для певної країни, де проводяться дослідження. Так, в роботі В. San Martin (2009) [15] досліджено період виведення чотирьох ветеринарних препаратів на основі енрофлоксацину на цільових тваринах курчатах-бройлерах з урахуванням МДР країн ЄС, Чилі та Японії. За статистичної оцінки отриманих даних, враховуючи, що МДР для країн ЄС і Чилі становив 100 і 200 мкг/кг для м'язів і печінки, відповідно, при цьому розглядаючи печінку як цільову тканину, період витримки не перевищував 5 днів для всіх досліджуваних препаратів. Однак, за обчисленням результатів, враховуючи МДР Японії – 10 мкг/кг, період виведення зростав до 8 днів [15].

ВИСНОВКИ

Для збереження здоров'я людей процес реєстрації нового чи перереєстрації не повністю дослідженого препарату обов'язково повинен включати визначення фармацевтичної

еквівалентності до референсного препарату або періоду виведення залишків діючих речовин. У цій статті продемонстровано основні стандартизовані етапи процедури визначення термінів виведення діючих речовин ветеринарних препаратів з різних типів продуктів тваринного походження на прикладі дослідження виведення діючої речовини двох ветеринарних препаратів на основі енрофлораксацину з цільових тканин (м'язів та печінки) курчат-бройлерів та молока корів.

Перспективи досліджень. На основі отриманих результатів будуть оформлені Методичні рекомендації з встановлення періоду витримки продуктивних сільськогосподарських тварин після лікування ветеринарними препаратами.

APPLICATION OF STANDARDIZED APPROACHES FOR THE DETERMINATION OF WITHDRAWAL PERIODS OF VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS FROM THE ORGANISM OF PRODUCTIVE ANIMALS

D. Yanovych, I. Kotsjumbas, Z. Zasadna, O. Pazderska, S. Kislova, N. Maiba

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

Quinolines of the second generation are most frequently used in veterinary medicine, and enrofloxacin, in particular, which was suggested for the treatment of bovine animals, pigs, dogs, cats, chickens and turkeys in the cases of diseases of respiratory, urinary and digestive systems. For a long time, the use of the above-mentioned drugs is increasingly followed with the cases of lowering their efficacy, which, in turn, leads to the increase of therapeutic doses of the produced drugs and may lead to the exceeding of established regulatory maximum residues limits of enrofloxacin and its metabolites in animal raw materials. These residues can carry significant risks to human health, stimulating the development of bacterial resistance and disturbing the microflora of the intestinal tract.

To reduce the risks to human health, European Union legislation sets the maximum residues levels (MRLs) for enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in food products, viz. for muscle tissues of all animals MRL is 100 µg/kg, for liver - 200 µg/kg (chickens, pigs, rabbits) and 300 µg/kg (cattle, sheep, goats); and for milk it is 100 µg/kg (Commission Regulation 37/2009). For the same purpose, the concept of a withdrawal period of residues of active pharmaceutical ingredients from an animal after the completion of their treatment until the concentration of the drug and/or its metabolites in target animal tissues is reduced to a safe level below the established MRL.

The purpose of this publication is to show the main stages of the procedure for determining the withdrawal period for veterinary preparations based on enrofloxacin from tissues (muscle, liver) of broiler chickens and milk of cows. We used RIDASCREEN Chinolone / Quinolones (Art No. R3113) test kits manufactured by R-Biopharm (Germany). Validation of the analytical methodology was carried out according to the EU Decision 657/2002 and Recommendation 20/1/2010, while its basic parameters were set, viz. the percentage of extraction (R, %), the decision limit (technical threshold, CC α), the detection capability (CC β) for the target samples. The results obtained in the kinetic experiment were counted according to the calculated percentage of extraction: 90.8, 105.6, 102.6% for samples of muscle, liver and milk. The statistical processing of the data obtained was carried out in accordance with the recommendations of EMEA/CVMP/036/95 and EMEA/CVMP/473/98, predicted time of the target animals' period of withdrawal was calculated using WT 1.4 software (for tissue samples) and WTM 1.4 (for milk samples) which involves the use of various statistical tests of the objective assessment of the unification of the data variance.

Based on the experimental data and the results of their statistical processing, the withdrawal period for chicken broilers was calculated to provide the MRL for enrofloxacin residues in muscle tissues at 6.74 days and 6.92 days for liver samples, according to the guidelines, the rounded value is 7.0 days. According to the results of the study, the withdrawal period of enrofloxacin from milk samples of cows was calculated to be 4.47 days, which is 5.0 days. Compliance with these established withdrawal periods provides 95% the probability that enrofloxacin residues level in muscle tissues and liver of chickens and in milk of cows will not exceed the MRL values, taking into account the limits of uncertainty of its methods of control.

However, the results presented in this article considering the analysis of withdrawal periods from target tissues of broiler chickens and milk for individual cows cannot serve as a dogma for all veterinary drugs of this type on the basis of enrofloxacin.

Keywords: WITHDRAWAL PERIOD, METHOD VALIDATION, STATISTICAL ASSESSMENT OF THE RESULTS, ENROFLOXACIN, MRL.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТАНДАРНЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРИОДОВ ВЫВЕДЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ОРГАНИЗМА ПРОДУКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ

Д. Янович, И. Коцюмбас, З. Засадна, О. Паздерская, С. Кислова, Н. Майба

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье обобщен опыт, полученный Национальной референс-лабораторией по контролю остаточных количеств ветеринарных препаратов и кормовых добавок ГНИКИ ветпрепаратов при использовании иммуноферментного метода для определения уровня остаточных количеств субстанций в тканях продуктивных сельскохозяйственных животных до безопасного уровня, установленного законодательством Украины и Европейского Союза. Рассмотрены этапы клинических исследований ветеринарных антимикробных лекарственных препаратов на основе антибиотика группы хинолонов, иллюстрирующие использование стандартизованных подходов к оценке пригодности вышеупомянутых методик для целей эксперимента и обсуждают критически важные точки процесса валидации методик в соответствии с критериями, установленным Решением Еврокомиссии 657/2002/ЕС и Рекомендациями референс-лабораторий ЕС в области контроля остаточных количеств 20/1/2010. Анализируются особенности метода, возможности их влияния на полученные результаты исследований и статистические подходы при получении расчётов прогнозируемых периодов выдержки продуктивных животных в соответствии с рекомендациями ЕМЕА/СVMP/036/95-FINAL.

Ключевые слова: ПЕРИОД ВЫВЕДЕНИЯ (КАРЕНЦИЯ), ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ, СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ, ЕНРОФЛОКСАЦИН, МДУ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States // A. D. Anderson, J. M. Nelson, S. Rossiter, F. J. Angulo / Microbial Drug Resistance. — 2003. — V. 9. — P. 373–379.

2. Quinolone resistance in the food chain / A. Fabrega, J. Sanches-Cespedes, S. Soto, J. Vila // Intern. J. Antimicrob. Agents. — 2008. — V. 31. — P. 307–315.
3. COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin OJ L 224, 18.8.1990, p. 1.
4. EC 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. Official Journal of the European Community. L 221:8–36.
5. Community Reference Laboratories Residues (Crls) 20/1/2010, Guidelines for the Validation of Screening Methods for Residues of Veterinary Medicines (Initial Validation and Transfer).
6. Оцінка придатності методу імуноферментного аналізу для визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів у продуктах тваринного походження / Д. В. Янович, З. С. Засадна, О. М. Паздерська, С. М. Кіслова // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. — 2018. — В. 19, № 1. — С. 310–319.
7. Implementing Council Directive Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of the results / Official Journal of the European Communities, 1.221, 2002/657/EC. — P. 23–33.
8. EMEA/CVMP/036/95 FINAL, Committee for Veterinary Medicinal Products Note for guidance for the determination of withdrawal periods.
9. EMEA/CVMP/473/98 FINAL, Committee for Veterinary Medicinal Products Note for guidance for the determination of withdrawal periods for milk.
10. Withdrawal-Time Calculation Program Wt1.4, Dr. P. Hekman
11. Gerard Moulin Responsible use of veterinary products: how to set a withdrawal period / Workshop for OIE national Focal Points for veterinary products (2 cycle) Vienna (Austria), — 2012. — 20-22 November.
12. Ellis R. FAO/WHO technical workshop on Residues of veterinary drugs without ADL/MRL. Food and Agriculture Organization and World Health Organization, Geneva — 2004. — P. 2–18.
13. B. KuKanich. Effect of formulation and route of administration on tissue residues and withdrawal times / B. KuKanich, R. Gehring, A. Webb, A. Graigmill, J. Riviere // J. of the Amer. Vet. Medical Association. — 2005. — V. 227. — P. 1574–1577.
14. Codex Alimentarius Programa Conjunto FAO / OMS sobre normas alimentarias. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, — 1995 — 3 — P. 50–93
15. Withdrawal time of four pharmaceutical formulations of enrofloxacin in poultry according to different maximum residues limits / B. San Martin, J. Cornejo, L. Lapierre, et al. // J. Vet. Pharmacol. Therap. — 2009. — V. 33. — P. 246–251.

Рецензент – Ю. М. Косенко, д. б. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.