

І.В. ЗАБАРНА, молодший науковий співробітник, лікар ветеринарної медицини науково-дослідного відділу ветеринарно-санітарної експертизи
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (м. Київ)

О.М. ЯКУБЧАК, доктор ветеринарних наук, професор
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Визначення тилозину в продукції птахівництва методом ELISA

У статті наведено результати з удосконалення моніторингових досліджень кількісного визначення тилозину в продукції птахівництва методом імуноферментного аналізу за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026) виробництва фірми Bioo Scientific Corporation, США, які будуть рекомендовані для використання в роботі регіональних державних лабораторій ветеринарної медицини.

Тилозин, імуноферментний аналіз (ELISA), продукти птахівництва, моніторинг, валідація

Важливу роль у забезпеченні виробництва продуктів харчування відіграє птахівництво як найбільш інтенсивна галузь тваринництва. Нині в сучасному птахівництві розвиваються нові напрями щодо створення безвідходного виробництва з високим рівнем ветеринарно-санітарної забезпеченості птахівничих підприємств, єдиним замкнутим технологічним процесом, що передбачає створення стійкого благополуччя щодо інфекційних і незаразних хвороб, отримання безпечних продуктів належної якості.

Під час промислового інтенсивно-потокowego способу ведення тваринництва, коли на обмежених площах, під одним дахом зосереджуються десятки тисяч тварин, крім проведення загальних ветеринарно-санітарних заходів, неухильно зростає і застосування різних лікувально-профілактичних лікарських засобів, біологічно активних речовин, велику частку яких складають антимікробні препарати. Зі значного арсеналу використовуваних у тваринництві антибіотиків, препарати тилозину останнім часом знайшли широке застосування у ветеринарній практиці [1]. У птахівництві препарати тилозину рекомендуються для лікування і профілактики цілої низки захворювань: спірохетозу, гемофільного риніту, колісептицемії, мікоплазмозу, сальмонельозу, інфекційних синуситів, а також для медикаментації до і в період стресу.

Однак при цьому виникає можливість забруднення ними продуктів тваринництва, використовуваних для харчування, що ставить перед ветсанекспертами завдання виключити небезпеку споживання забруднених продуктів.

Відповідно до директиви 96/23/ЕС від 29 квітня 1996 року [2] необхідно регулярно проводити моніторинг вмісту залишкових кількостей заборонених та дозволених ветеринарних препаратів у живих тварин та в продуктах тваринного походження з метою захисту споживача від шкідливого впливу залишкових кількостей вете-

ринарних препаратів, що можуть забруднювати продукцію тваринного походження, зокрема м'ясо та м'ясопродукти, молоко, яйця і мед тощо.

Слід зазначити, що стосовно термінів витримки тварин до забою після використання препаратів тилозину немає єдиних рекомендацій, що свідчить про недостатню вивченість даної проблеми. До того ж, є численні дані, що препарати тилозину є сильними алергенами для тварин, а продукти забою можуть бути більш токсичними і здійснювати небажаний вплив на здоров'я людини.

Одним із методів контролю є своєчасне виявлення залишків цих препаратів у продуктах та живих тваринах за допомогою лабораторних методів. Виникає необхідність розробки високочутливих, простих і доступних методів визначення вмісту тилозину в продуктах птахівництва для ветеринарної практики. Таким методом, що використовується для визначення залишкових кількостей тилозину є імуноферментний аналіз (ELISA).

Мета роботи – удосконалити моніторингові дослідження, провести валідацію та розробити методичні рекомендації з кількісного визначення тилозину методом імуноферментного аналізу в продукції птахівництва за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026), які будуть рекомендовані для впровадження у роботу регіональних державних лабораторій ветеринарної медицини.

Матеріали і методи досліджень. Визначення залишкових кількостей тилозину в м'язовій тканині птиці (курей та гусей) та яйцях проводили методом ІФА на імуноферментному аналізаторі "Tecan Sunrise" (виробництво фірми "Sunrise", Австрія) за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026) виробництва фірми Bioo Scientific Corporation, США [3] відповідна до вимог Директиви ЄС 96/23 від 29 квітня 1996 року і Рішення

1. Результати досліджень м'язів птиці під час отримання валідаційних даних

№ зразка	Холості зразки, мкг/кг	Збагачені зразки на рівні ЦКС – 10 мкг/кг
1	8,70	11,84
2	8,30	12,00
3	8,37	12,92
4	8,77	12,50
5	7,66	14,54
6	9,32	12,71
7	8,97	12,71
8	9,44	12,08
9	7,61	11,89
10	7,58	12,73
11	8,82	12,17
12	8,44	11,85
13	7,34	12,22
14	7,37	13,02
15	7,39	12,73
16	6,07	12,62
17	7,29	12,62
18	5,58	13,72
19	6,11	11,96
20	6,04	12,59

2. Результати досліджень зразків яєць під час отримання валідаційних даних

№ зразка	Холості зразки, мкг/кг	Збагачені зразки на рівні ЦКС – 3,0 мкг/кг
1	1,95	3,08
2	2,07	3,16
3	1,74	2,99
4	1,52	3,08
5	2,01	3,25
6	1,43	3,08
7	1,51	3,52
8	1,88	3,25
9	2,00	3,47
10	1,65	3,64
11	1,30	3,52
12	1,54	3,64
13	1,18	3,30
14	1,48	3,42
15	1,87	3,55
16	2,02	3,68
17	2,09	3,56
18	2,43	3,48
19	1,70	3,46
20	2,19	3,03

Комісії Євросоюзу 657/2002 від 12 серпня 2002 року.

Результати досліджень. Вперше в Україні спеціалістами науково-дослідного відділу ветеринарно-санітарної експертизи Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ) удосконалено моніторингові дослідження шляхом розроблення та валідування методики з кількісного визначення тилозину в пробах м'язів птиці (курей та гусей), яєць за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026) виробництва фірми Bioo Scientific Corporation, США.

Необхідно зазначити, що тилозин – це антибіотик з групи макролідів, який у Європейському Союзі відноситься до заборонених ветеринарних препаратів щодо використання під час вирощування птиці. Для заборонених ветеринарних препаратів, або недозволених аналізів, встановлений мінімальний відносний дозволений рівень (МВДР). Межа детектування підтверджуючого методу для м'язів птиці та яєць складає 25 мкг/кг [4].

Згідно Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЕС від 12 серпня 2002 року до мінімальних робочих параметрів для проведення валідації методів відносять: здатність виявлення (ССβ), прецизійність, селективність, специфічність, застосовність, стійкість, стабільність [5].

Кількість проб, необхідних для валідації для кожного аналізу, залежить від ступеня статистичної вірогідності, необхідної в результаті, і залежності між цільовою концентрацією скринінгу та регулятивною межею. Цільова концентрація скринінгу для заборонених і недозволених аналітів має бути на рівні або нижче ніж МВДР.

Під час проведення валідації з кількісного визначення тилозину в м'язах птиці (курей та гусей) були визначені наступні робочі характеристики: межа детектування, ССβ, рівень відсічення.

Межа детектування (Limit of detection, LOD; Decision limit) – найнижча концентрація аналіту, яку можна виміряти за допомогою даного приладу з належною статистичною вірогідністю. Для визначення межі детектування проводили дослідження 20 холостих зразків, що містять аналіт в незначній кількості. Згідно отриманих даних (табл. 1), середнє значення холостих зразків складає $\bar{X}_{\text{сер.}}$ – 7,8; стандартне відхилення SD – 1,15; межа детектування LOD – 11,25 мкг/кг.

Здатність виявлення (ССβ) – це найменший вміст аналіту, що може бути встановлений, ідентифікований та кількісно визначений у зразку з ймовірністю помилки (для скринінгових методів β-помилка має бути <5%) [6]. Для визначення ССβ проводили дослідження 20-и холостих зразків матриці (10 зразків м'язів курей та 10 зразків м'язів гусей). Реплікати цих зразків збагачували на рівні цільової концентрації скринінгу – 10 мкг/кг.

Найвища відповідь, яка відзначена для холостих зразків – 9,32 мкг/кг. Найнижча відповідь, відзначена для збагачених зразків – 11,84 мкг/кг. Жодна з відповідей для збагачених зразків не збігається з діапазоном відповідей холостих зразків, тому можна констатувати, що ССβ цього скринінг-методу менша або дорівнює 10 мкг/кг, β-помилка – <5%. Рівень відсічення цього тесту – 11,84.

Під час проведення валідації з кількісного визначення

тилозину в зразках яєць були визначені ті ж самі робочі параметри, що й у м'язах птиці. Для визначення межі детектування проводили дослідження 20-и холостих зразків яєць (табл. 2). Відповідно, були отримані наступні дані: $X_{\text{сер.}} - 1,8$; $SD - 0,32$; $LOD - 2,8$ мкг/кг.

Для визначення ССВ проводили дослідження 20-и холостих зразків яєць. Реплікати цих зразків збагачили на рівні цільової концентрації скринінгу – 3,0 мкг/кг. Результати досліджень наведено в табл. 2.

Наведені дані свідчать про те, що найвищі результати, відзначені для холостих зразків – 2,43 мкг/кг. Найнижчі результати, отримані для збагачених зразків – 2,99 мкг/кг. Жоден із отриманих результатів для збагачених зразків не збігається з діапазоном отриманих результатів для холостих зразків, тому можна констатувати, що ССВ цього скринінг-методу менша або дорівнює 3,0 мкг/кг, β -помилка – <5%, рівень відсічення цього тесту – 2,99.

За результатами отриманих валідаційних даних були розроблені методичні рекомендації з кількісного визначення залишкових кількостей тилозину методом імуноферментного аналізу в зразках м'яса, печінки, нирок, яєць, молока, меду, комбікормів та сечі за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026) виробництва фірми Bioo Scientific Corporation (США) для спеціалістів регіональних державних лабораторій ветеринарної медицини. Методичні рекомендації будуть впроваджені в роботу державних лабораторій ветеринарної медицини, що дозволить якісно проводити дослідження з визначення залишкових кількостей тилозину, включити до виконання Плану державного моніторингу більшу кількість лабораторій з метою рівномірного розподілу навантаження між областями.

Висновки

1. Під час проведення валідації з кількісного визначення тилозину в м'язах птиці (курей та гусей) отримані наступні валідаційні дані: $X_{\text{сер.}} - 7,8$, $SD - 1,15$, $LOD - 11,25$ мкг/кг, $CC - 10$ мкг/кг, β -помилка – <5%, рівень відсічення – 11,84.

Література

1. Кожин Ю.В. Ветеринарно-санитарная оценка мяса птиц с остаточным количеством антибиотиков группы макролидов: автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата биол. наук : спец. 16.00.06 "Ветеринар. санитария, экология, зоогигиена и ветеринар.-санитар. экспертиза" / Юрий Васильевич Кожин. – Казань, 2004. – 24 с.
2. 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,

2. У результаті дослідження зразків яєць отримані наступні валідаційні дані: $X_{\text{сер.}} - 1,8$; $SD - 0,32$; $LOD - 2,8$ мкг/кг, $CC\beta - 3,0$ мкг/кг, β -помилка – <5%, рівень відсічення – 2,99.

3. На підставі отриманих валідаційних даних під час проведення досліджень з визначення залишкової кількості тилозину методом імуноферментного аналізу за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026) встановлено, що представлена тест-система дозволить ретельно контролювати з додержанням всіх вимог потрапляння залишків тилозину в продукцію птахівництва.

В статье приведены результаты по усовершенствованию мониторинговых исследований путем проведения валидации и разработаны методические рекомендации по количественному определению тилозина в продукции птицеводства методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы для конкурентного иммуноферментного анализа MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026) производства фирмы Bioo Scientific Corporation, США, которые будут рекомендованы для внедрения в работу региональных государственных лабораторий ветеринарной медицины.

Тилозин, иммуноферментный анализ (ELISA), продукты птицеводства, мониторинг, валидация

The article contains the results of monitoring studies to improve through validation and development of methodological recommendations for the quantitative determination of tylosin by ELISA method in poultry products by using test systems for competitive ELISA MaxSignal® Tylosin (Cat. No.: 1026) production firm Bioo Scientific Corporation U.S., which will be recommended for implementation in the work of regional state veterinary medicine laboratories.

Tylosin, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), poultry products, monitoring, validation

23.5.1996. – 10 с.

3. BIOO Scientific Maximize. Science for life BIOO Food and feed safety. Max Signal® Tylosin ELISA Test Kit Manual (Art. No.: 1026), USA. (Рекомендації виробника).

4. План державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження на 2012 рік // Наказ Державного комітету ветеринарної медицини України від 22 грудня 2011 року №143.

5. Решение комиссии 657/2002 от 12 августа 2002 года, обеспечивающее выполнение Директивы Совета 96/23/ЕС касательно эффективности аналитических методов и интерпретации результатов // SANCO-2004.-2726.- rev.1.