

**УДОСКОНАЛЕННЯ МОНІТОРИНГОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ
ПРОДУКЦІЇ ПТАХІВНИЦТВА З КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ТИЛОЗИНУ МЕТОДОМ ELISA**

***І.В.Забарна, молодший науковий співробітник
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної
діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
О.М.Якубчак, доктор ветеринарних наук, професор
Національний університет біоресурсів
і природокористування України***

Наведено результати з удосконалення моніторингових досліджень кількісного визначення тилозину методом імуноферментного аналізу за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026), виробництва фірми Bioo Scientific Corporation, США, у продукції птахівництва за проведення валідації.

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

Важливе значення у забезпеченні виробництва продуктів харчування має птахівництво, як найінтенсивніша галузь тваринництва. Нині у 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, великою часткою яких є антимікробні препарати. Зі значного арсеналу використовуваних у тваринництві антибіотиків, препарати тилозину останнім часом набули широкого застосування у ветеринарній практиці [2]. У птахівництві препарати тилозину рекомендуються для лікування і профілактики цілого ряду захворювань: спірохетозу, гемофільного риніту, колісептицемії, мікоплазмозу, сальмонельозу, інфекційних синуситів, а також для медикаментації до і у період стресу.

Однак у цьому разі постає загроза забруднення ними продуктів тваринництва, використовуваних для харчування, що висуває перед

ветсанекспертами завдання усунути небезпеку споживання забруднених продуктів.

Відповідно до директиви 96/23/ЕС від 29 квітня 1996 року [1] необхідно регулярно проводити моніторинг вмісту залишкових кількостей заборонених та дозволених ветеринарних препаратів у живих тваринах та продуктах тваринного походження для захисту споживача від шкідливого впливу залишкових кількостей ветеринарних препаратів, що можуть забруднювати продукцію тваринного походження, зокрема м'ясо та м'ясопродукти, молоко, яйця та мед тощо.

Слід зазначити, що питання щодо термінів витримки тварин до забою після використання препаратів тилозину не має єдиних рекомендацій, що свідчить про недостатню вивченість цієї проблеми. До того ж, є численні дані, що препарати тилозину є сильними алергенами для тварин, а продукти забою можуть бути більш токсичними і негативно впливати на здоров'я людини.

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

Мета дослідження – удосконалити моніторингові дослідження, провести валідацію та розробити методичні рекомендації з кількісного визначення тилозину методом імуноферментного аналізу у 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 та методи дослідження. Визначення залишкових кількостей тилозину у м'язовій тканині птиці (курей та гусей), яєць проводили методом ІФА на імуноферментному аналізаторі «Tescan Sunrise» (виробництво фірми «Sunrise», Австрія) за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026), виробництво фірми Bioo Scientific Corporation, США [3], відповідно до вимог Директиви ЄС 96/23 від 29 квітня 1996 року і Рішення Комісії Євросоюзу 657/2002 від 12 серпня 2002 року.

Результати дослідження. 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 завдяки розробленню та валідуванню 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), виробництво фірми Bioo Scientific Corporation, США.

Необхідно зазначити, що тилозин – це антибіотик з групи макролідів, що належить до заборонених ветеринарних препаратів у Європейському Союзі під час вирощування птиці. Для заборонених ветеринарних препаратів або недозволених аналітів встановлений мінімальний відносний дозволений рівень (МВДР). Межа детектування підтверджуючого методу для м'язів птиці та яєць становить 25 мкг/кг [3].

Згідно з Рішенням Європейської Комісії 2002/657/ЕС від 12 серпня 2002 року до мінімальних робочих параметрів для проведення валідації методів належать: здатність виявлення (ССβ), прецизійність, селективність, специфічність, застосованість, 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 [4]. Цільова концентрація скринінгу для заборонених і недозволених аналітів має бути на рівні або нижче ніж МВДР.

Під час проведення валідації з кількісного визначення тилозину у м'язах птиці (курей та гусей), визначено такі робочі характеристики: межа детектування, ССβ, рівень відсічення.

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

Межа детектування (Limit of detection, LOD; Decision limit) – найнижча концентрація аналіту, яку можна виміряти за допомогою цього приладу з належною статистичною вірогідністю. Для визначення межі детектування проводили дослідження 20 холостих зразків, що містять

аналіт у незначній кількості. Згідно з отриманими даними (табл. 1), середнє значення холостих зразків становить $X_{\text{сер.}} = 7,8$; стандартне відхилення $SD = 1,15$; межа детектування $LOD = 11,25$ мкг/кг.

Здатність виявлення ($CC\beta$) – це найменший вміст аналіту, що може бути встановлений, ідентифікований та кількісно визначений у зразку з ймовірністю помилки β (для скринінгових методів β -помилка має бути $<5\%$) [4]. Для визначення $CC\beta$ проводили дослідження 20 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, зазначена для холостих зразків – 9,32 мкг/кг. Найнижча для збагачених зразків – 11,84 мкг/кг. Жодна з відповідей для збагачених зразків не збігається з діапазоном відповідей холостих зразків, тому можна констатувати, що $CC\beta$ 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 у зразках яєць визначено ті ж самі робочі параметри, що й у м'язах птиці. Для визначення межі детектування проводили дослідження 20 холостих зразків яєць (табл. 2). Відповідно, отримано такі показники: $X_{\text{сер.}} = 1,8$; $SD = 0,32$; $LOD = 2,8$ мкг/кг.

Для визначення $CC\beta$ досліджували 20 холостих зразків яєць. Реплікати цих зразків збагачували на рівні цільової концентрації скринінгу – 3,0 мкг/кг. Результати досліджень наведено в табл. 2.

2. Результати досліджень зразків яєць під час отримання валідаційних даних

Номер 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

Дані, наведені в табл. 2, свідчать про те, що найвищі результати, зазначені 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 ССβ цього скринінг-методу менша або дорівнює 3,0 мкг/кг, β-помилка – <5 %, рівень відсічення цього тесту – 2,99.

За результатами отриманих валідаційних даних розроблено методичні рекомендації з кількісного визначення залишкових кількостей тилозину методом імуноферментного аналізу у 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 дасть змогу якісно проводити дослідження з визначення залишкових кількостей тилозину, включити до виконання Плану державного моніторингу більшу кількість лабораторій для рівномірного розподілу навантаження між областями.

Висновки

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

2. За результатами дослідження зразків яєць отримано такі валідаційні дані: $X_{\text{сер.}}$ – 1,8; SD – 0,32; LOD – 2,8 мкг/кг, ССβ – 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 наведена тест-система дасть змогу ретельно контролювати з додержанням всіх вимог потрапляння залишків тилозину до продукції птахівництва.

Список літератури

1. 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. – с. 10

2. Кожин Ю.В. Ветеринарно-санитарная оценка мяса птиц с остаточным количеством антибиотиков группы макролидов: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 06.02.05 – «Ветеринарная санитария,

экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза» / Кожин Юрий Василевич.– Казань, 2004. – 24 с.

3. 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.

4. Посібник з валідації скринінг-методів для аналізу залишкових речовин ветеринарних препаратів (Початкова валідація та валідація при передачі методів) від 20/1/2010.

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.

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

Представлены результаты по усовершенствованию мониторинговых исследований путем проведения валидации и разработаны методические рекомендации по количественному определению тилозина методом иммуноферментного анализа в продукции птицеводства с помощью тест-системы для конкурентного иммуноферментного анализа MaxSignal® Тилозин (Cat. No.: 1026) производство 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.