

*list of pathogens, antibacterial drugs, methods of research, development of reporting forms for the purpose of systematization of the data.*

**Keywords:** *antibiotics, antibacterial drugs, resistance, sensitivity to antibiotics.*

#### REFERENCES

1. Feshchenko, Y.I., Humeniuk, M.I., & Denysov, O.S. (2010). AntybiotykoRezystentnist mikroorhanizmv. Stan problemy ta shliakhy vyrishennia [Antibiotic resistance of microorganisms. State problems and solutions]. *Ukrainskyi khimioterapevtychnyi zhurnal – Ukrainian chemotherapeutic magazine*, 1-2 (23), 4-10 [in Ukrainian].
2. Mezhenka, N.A. AntybiotykoRezystentnist mikroorhanizmv v systemi bezpechnosti kharchovykh produktiv ta kormiv. [Antibiotic resistance microorganisms in the system enshuring safety and qualiti.]. Retrived from [http://nd.nubip.edu.ua/2014\\_7/23.pdf](http://nd.nubip.edu.ua/2014_7/23.pdf) [in Ukrainian].
3. Morua, A. (1964). *Zhyttia Oleksandra Flevinha [Life of Alexander Fleming]*. Moscow: Molodaia hvardia [in Ukrainian].
4. Holovko, A.N., Ushkalov, V.A., Skrypnyk, V.H., & Stehnyi, B.T. et al. (2007). *Mikrobiolohicheskie i virusolohicheskie metody issledovania v veterinarnoi meditsine [Microbiological and virological research methods in veterinary medicine]*. A.N. Holovko (Ed.). Kharkiv: «NTMT» [in Russian].
5. Harkavenko, T.O., Nevolko, O.M., Kozytska, T.H., Ordynska, D.O., & Mezhenka, N.A. (2014). Vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmv do antybakterialnykh preparativ [Determining the sensitivity of microorganisms to antibiotics]. *Guidance*. Kiev: SSRILDVSE [in Ukrainian].

**УДК 619:614.31:615.35:636.5'65:579**

**ГАРКАВЕНКО Т.О.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: [bac@vetlabresearch.gov.ua](mailto:bac@vetlabresearch.gov.ua),

**АЗИРКІНА І.М.**, e-mail: [azirkina@vetlabresearch.gov.ua](mailto:azirkina@vetlabresearch.gov.ua),

**ШАЛІМОВА Л.О.**, e-mail: [microb\\_antib@ukr.net](mailto:microb_antib@ukr.net)

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

### **ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ МАКРОЛІДІВ ТА $\beta$ -ЛАКТАМІВ У ПРОДУКЦІЇ ПТАХІВНИЦТВА МІКРОБІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ**

*В статті наведені дані щодо апробації та валідації методу «NAT-screening» визначення залишкової кількості макролідів та  $\beta$ -лактамів у продукції птахівництва мікробіологічним методом.*

*Визначено специфічність, точність та чутливість 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 груп макролітів та  $\beta$ -лактамів.*

**Ключові слова:** *тест-культура *Cocuria rhizophila* ATCC 9341, макроліди, тілозін,  $\beta$ -лактами, м'ясо птиці, яйця, NAT-screening, яєчні продукти.*

**Вступ.** Антибіотики посідають важливе місце в забрудненні продуктів харчування, особливо продукції птахівництва, зокрема їх впливу на здоров'я людини і довкілля приділяють велику увагу практично всі країни Європи,

Великобританія, Канада і США. При застосуванні тилозину з групи макролідів в якості кормових добавок для тварин, залишкові його кількості у продукції тваринного походження становлять можливий ризик для споживача, вони можуть викликати перехресну резистентність з антибіотиками, що використовуються для людини, і різні токсичні явища. Крім того, було виявлено, що саме антибіотики групи макролідів і  $\beta$ -лактамів є потенційними алергенами: можуть викликати порушення обміну речовин, зниження або підвищення утворення ферментів в організмі, порушення балансу гормонів, що призводить до виникнення алергічних захворювань [1–3].

Більшість антибіотиків з місця введення у великій кількості потрапляють в регіонарні лімфовузли, нирки та печінку. Нижчий вміст їх виявляється у віддалених лімфовузлах, селезінці, кістковому мозку, тимусі і легенях. В лімфовузлах та в деяких органах у перші дні після введення антибіотики накопичуються переважно зовні клітин та адсорбуються лімфоцитами різного походження. Значна їх кількість виявляється в звивистих канальцях нирок і просвітах сечовивідних шляхів, а також в печінкових клітинах і жовчних протоках. Все це свідчить про те, що нирки і печінка беруть безпосередню участь в елімінації антибіотиків [1–3].

Єдина концепція і підхід до застосування лікарських препаратів за принципом найсуворішого контролю їх використання, розроблення і застосування різних сучасних мікробіологічних методів аналізу антибіотиків дозволять організувати виробництво продуктів здорового харчування, що не міститимуть залишків препаратів та відповідатимуть вимогам стандартів щодо безпечності та якості [1–3].

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/EC (Рішення Комісії 2002/657/EC), які гармонізовані в Україні в Наказі №695 від 06.08.2013 р.

З березня 2004 р. в країнах ЄС з метою визначення залишкових кількостей макролідів (тилозин, лінкоміцин, тіамулін, спіраміцин, тілмікозин, еритроміцин) та  $\beta$ -лактамів (ампіцилін, амоксицилін, клоксацилін, діклоксацилін, оксацилін) використовують скринінговий мікробіологічний метод – «A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening)» [3].

В основі мікробіологічного методу визначення макролідів та  $\beta$ -лактамів 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 [4].

«NAT-screening» був валідований та затверджений відповідно до 2002/657/EC та акредитований за Dutch Accreditation Council в ISO 17025. Чутливість цього методу для макролідів та  $\beta$ -лактамів відповідає

максимальнодопустимим 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 [4–8].

**Мета** нашої роботи полягала у порівняльному аналізі національних та європейських мікробіологічних скринінг-методів та проведенні апробації, валідації якісного мікробіологічного методу «NAT-screening» визначення макролідів та  $\beta$ -лактамів в м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах.

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

Для встановлення межі чутливості мікробіологічного методу «NAT-screening» з визначення залишків макролідів та  $\beta$ -лактамів було проведено дослідження на модельованих пробах м'яса птиці, яєць та яєчних продуктів: вільних від антибіотиків та із додаванням аналітів цих же антибіотиків у концентраціях  $\frac{1}{2}$  МДР та МДР. Дослідження проводились у 20 повторюваностях.

**Підготовка тест-культури мікроорганізму та чашок з тестовим агаром.** Для дослідження використовували музейний штам тест-культури *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, чутливої до макролідів та  $\beta$ -лактамів у концентрації  $10^6$  КУО/см<sup>3</sup>. Використовували поживні середовища Hi-Sensitivity Test Agar (виробництва HIMEDIA, Індія) з рН 8,0. Агар заливали в чашки Петрі шаром 2,5 мм.

**Стандарт антибіотика.** Використовували стандарт «Тилозин» (виробника Sigma Aldrich) – основний розчин антибіотика розводили 1,5 М фосфатним буферним розчином з рН 8,0. Розчин тілозину з активністю 0,05 мкг вносили по 100 мкл в чашки з тестовим агаром на диск 12,7 мм, Whatman, Schleicher & Schuell, 's Hertogenbosch, Netherlands.

**Підготовка 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 діаметром 12,7 мм, Whatman, Schleicher & Schuell, 's Hertogenbosch, Netherlands.

Яєчний порошок попередньо розводили дистильованою водою та прогрівали у водяній бані за температури  $65 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин. Просочували диски діаметром 12,7 мм, Whatman, Schleicher & Schuell, 's Hertogenbosch, Netherlands суспензією зразка.

В кожній чашці з тестовим агаром робили по 2 лунки діаметром 14 мм, в які заливали 1,5 М фосфатний буферний розчин (рН 8,0) до межі луночки, після чого в них вкладали, користуючись пінцетом, диски, просочені соком однієї проби, один навпроти одного.

Чашки інкубували протягом 16–18 годин за температури  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Після інкубації чашки оглядали на наявність зон інгибування тест-культури *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 навколо лунок.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програми «Microsoft Excel 2015,0» із обчисленням середнього арифметичного (M), стандартної похибки (m) та рівня вірогідності (p) за таблицею Стюдента. Різницю між двома величинами вважали вірогідною при  $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,001$ .

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

Для встановлення межі чутливості мікробіологічного методу «NAT-screening» з визначення залишків макролідів та  $\beta$ -лактамів було проведено дослідження, на модельованих пробах м'яса птиці, яєць та яєчних продуктів: пробах м'яса, вільних від антибіотиків (негатив), та в пробах із внесеними стандартними розчинами антибіотиків у концентраціях  $\frac{1}{2}$  МДР, МДР; пробах яєчних продуктів та яйцях, вільних від антибіотиків та з додаванням аналітів у концентраціях  $\frac{1}{2}$  МДР та МДР цих же антибіотиків (табл. 1). Дослідження проводились у 20 повтореннях.

Таблиця 1

**Концентрація антибіотиків внесених у проби,  $M\pm m$ ,  $n=20$**

| Антибіотики   | М'ясо             |             | Яйця та яєчні продукти |              |
|---------------|-------------------|-------------|------------------------|--------------|
|               | $\frac{1}{2}$ МДР | МДР         | $\frac{1}{2}$ МДР      | МДР          |
| Ампіцилін     | 25 $\pm$ 1        | 50 $\pm$ 1  | –                      | –            |
| Амоксицилін   | 25 $\pm$ 1        | 50 $\pm$ 1  | –                      | –            |
| Клоксацилін   | 150 $\pm$ 1       | 300 $\pm$ 1 | –                      | –            |
| Діфлуксацилін | 150 $\pm$ 1       | 300 $\pm$ 1 | –                      | –            |
| Оксацилін     | 150 $\pm$ 1       | 300 $\pm$ 1 | –                      | –            |
| Тилозин       | 50 $\pm$ 1        | 100 $\pm$ 1 | 100 $\pm$ 1            | 200 $\pm$ 1  |
| Лінкоміцин    | 50 $\pm$ 1        | 100 $\pm$ 1 | 25 $\pm$ 1             | 50 $\pm$ 1   |
| Тіамулін      | 50 $\pm$ 1        | 100 $\pm$ 1 | 500 $\pm$ 1            | 1000 $\pm$ 1 |
| Спіраміцин    | 100 $\pm$ 1       | 200 $\pm$ 1 | –                      | –            |
| Тілмікозин    | 38 $\pm$ 1        | 75 $\pm$ 1  | –                      | –            |
| Еритроміцин   | 100 $\pm$ 1       | 200 $\pm$ 1 | 75 $\pm$ 1             | 150 $\pm$ 1  |

**Результати дослідження та їх обговорення.** Встановлено, що на даний час в Україні в рамках періодичного контролю продукцію птахівництва мікробіологічним методом не досліджують на залишкові кількості макролідів та  $\beta$ -лактамів [8]. 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 (табл. 2).

Таблиця 2

**Порівняння показників та МДР макролідів і β лактамів у продукції птахівництва за діючими нормативними документами України та ЄС**

| Антибіотики   | CAC/MRL 02 Codex Alimentarius Commission, мкг/кг | Регламент Комісії (ЄС) №37/2010, мкг/кг | Обов'язковий мінімальний перелік досліджень, МБТ (національне законодавство) | Наказ №695 від 06.08.2013 р., мкг/кг |
|---------------|--|---|--|--------------------------------------|
| М'ясо птиці   |  |   |  |                                      |
| Ампіцилін     | –  | 50                                      | –  | 50                                   |
| Амоксицилін   | –  | 50                                      | –  | 50                                   |
| Клоксацилін   | –  | 300                                     | –  | 300                                  |
| Діфлоксацилін | –  | 300                                     | –  | 300                                  |
| Оксацилін     | –  | 300                                     | –  | 300                                  |
| Тилозин       | 100  | 100                                     | –  | 100                                  |
| Лінкоміцин    | 200  | 100                                     | –  | 100                                  |
| Тіамулін      | –  | 100                                     | –  | 100                                  |
| Спіраміцин    | 200  | 200                                     | –  | 200                                  |
| Тілмікозин    | 150  | 75                                      | –  | 75                                   |
| Еритроміцин   | 100  | 200                                     | –  | 200                                  |
| Яйця          |  |   |  |                                      |
| Еритроміцин   | 50   | 150                                     | –  | –                                    |
| Лінкоміцин    | –  | 50                                      | –  | –                                    |
| Тіамулін      | –  | 1000                                    | –  | –                                    |
| Тілозін       | 300  | 200                                     | –  | –                                    |

Провівши серію дослідів, встановлено, що навколо луночок із внесеним стандартом спостерігаються чітко окреслені, чисті від росту тест-культури *Kocuria rhizophila* АТСС 9341 зони інгибування, які коливаються в межах від 17,01±0,01 до 20,03±0,03 мм.

Всі негативні проби не давали зони із затримкою росту навколо дисків, просочених рідиною проби, спостерігали суцільний ріст тест-культури.

В пробах продукції птахівництва, в які було внесено антибіотики групи макролідів та β лактамів, спостерігались навколо дисків, просочених рідиною проби, чітко окреслені зони затримки росту тест-культури *Kocuria rhizophila* АТСС 9341. Результати щодо діаметрів зон інгибування для різних продуктів та різних антибіотиків наведені в табл. 3 та 4.

Аналізуючи одержані дані, спостерігали, що зони інгибування навколо проб м'яса з ½ МДР клоксациліну мали найнижчі зони затримки росту і становили 17,01±0,01 мм, а найвищі зони затримки росту 18,03±0,03 мм спостерігали навколо дисків, просочених рідиною проб із додаванням тіамуліну, еритроміцину, тилмікозину на рівні ½ МДР.

В пробах яєць найнижчі зони затримки росту були навколо проб із додаванням еритроміцину на рівні 18,01±0,01 мм, найвищі ж зони затримки росту лінкоміцину, тіамуліну, тілозину 18,03±0,02 мм були навколо проб із додаванням на рівні ½ МДР.

Таблиця 3

**Діаметри зон затримки росту тест-культури *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 навколо проб м'яса з доба додаванням аналітів мм,  $M \pm m$ ,  $n=20$**

| Антибіотики   | Концентрація антибіотика в пробах  |                     |   |   |
|---------------|--|---------------------|---|---|
|               | Негативний контроль  | Контроль (стандарт) | Проба з додаванням аналіту на рівні ½ МДР | Проба з додаванням аналіту на рівні МДР |
| Ампіцилін     | Відсутні зони затримки росту тест-культури навколо дисків, просочених рідиною проб | 17±0,05 мм          | 17,03±0,01                                | 18,03±0,02                              |
| Амоксицилін   |  |                     | 17,03±0,02                                | 18,03±0,02                              |
| Клоксацилін   |  |                     | 17,01±0,01                                | 18,01±0,01                              |
| Діфлоксацилін |  |                     | 17,03±0,03                                | 18,01±0,01                              |
| Оксацилін     |  |                     | 17,03±0,03                                | 18,03±0,03                              |
| Тилозин       |  |                     | 18,01±0,01                                | 20,01±0,01                              |
| Лінкоміцин    |  |                     | 18,01±0,01                                | 20,01±0,01                              |
| Тіамулін      |  |                     | 18,03±0,03                                | 20,03±0,03                              |
| Спіраміцин    |  |                     | 18,01±0,01                                | 20,03±0,03                              |
| Тілмікозин    |  |                     | 18,03±0,03                                | 20,03±0,03                              |
| Еритроміцин   |  |                     | 18,03±0,02                                | 18,03±0,02                              |

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

Таблиця 4

**Діаметри зон затримки росту тест-культури *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 навколо проб яєць з додаванням аналітів,  $M \pm m$ , мм,  $n=20$**

| Антибіотики | Концентрація антибіотика в пробах          |                     |   |   |
|-------------|--|---------------------|---|---|
|             | Негативний контроль                        | Контроль (стандарт) | Проба з додаванням аналіту на рівні ½ МДР | Проба з додаванням аналіту на рівні МДР |
| Еритроміцин | Відсутні зони затримки росту тест-культури | 18±0,05 мм          | 18,01±0,01                                | 20,03±0,03                              |
| Лінкоміцин  |  |                     | 18,03±0,02                                | 20,03±0,03                              |
| Тіамулін    |  |                     | 18,03±0,02                                | 20,03±0,03                              |
| Тилозин     |  |                     | 18,03±0,02                                | 20,03±0,02                              |

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

Що ж до результатів із добавкою клоксациліну, діфлоксациліну в пробах м'яса на рівні 1 МДР, то зони інгибування становили 18,01±0,01 мм, найвищі ж зони затримки росту були 20,03±0,03 мм та спостерігалися навколо дисків, просочених рідиною проб із додаванням тіамуліну, спіраміцину, тилмікозину на рівні 1 МДР.

Проте, в пробах яєць на рівні 1 МДР найнижчі зони затримки росту 20,03±0,02 мм були навколо дисків проб із рідиною тілозину, найвищі ж затримки росту проб із додаванням антибіотика спостерігали навколо дисків, просочених рідиною проб з еритроміцином, лінкоміцином, тіамуліном – 20,03±0,03 мм.

Виходячи з отриманих результатів, можна зробити висновок, що найнижчий рівень визначення (½ МДР) залишкових кількостей макролідів та β лактамів для *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 за допомогою якісного мікробіологічного скринінг-методу «NAT-screening» для м'яса становить

25 мкг/кг, для яєць та яєчних продуктів – 50 мкг/кг Специфічність, точність та чутливість даного методу була 100%.

**Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. На сьогоднішній день в Україні продукція птахівництва не контролюється на залишкові кількості макролідів та β-лактамів, з вересня 2016 року стає обов'язковим визначення макролідів та β-лактамів.

2. Встановлено, що чутливість скринінгового мікробіологічного методу «NAT-screening» залишкових кількостей макролідів та β-лактамів для м'яса становив тилозин – 100 мкг/кг, лінкоміцин – 100 мкг/кг, тіамулін 100 – мкг/кг, спіраміцин – 200 мкг/кг, тілмікозин – 75 мкг/кг, еритроміцин – 200 мкг/кг, ампіцилін – 50 мкг/кг, амоксицилін – 50 мкг/кг, клоксацилін – 300 мкг/кг, діклоксацилін – 300 мкг/кг, оксацилін – 300 мкг/кг, для яєць та яєчних продуктів – еритроміцин – 150 мкг/кг, лінкоміцин – 50 мкг/кг, тіамулін – 1000 мкг/кг, тілозин – 200 мкг/кг, що відповідає МДР європейського законодавства та наказу №695 від 06.08.2013 р.

3. Встановлено, що специфічність «NAT-screening» становить 100%.

У зв'язку з розширенням критеріїв дослідження продукції птахівництва на залишкові кількості макролідів та β-лактамів у рамках періодичного контролю слід впровадити в роботу лабораторій ветеринарної медицини метод «NAT-screening».

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Степна О.О. Ветеринарно-санітарна оцінка продуктів птахівництва при асоційованому перебігу ешерихіозу і еймеріозу [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://repo.sau.sumy.ua/handle/123456789/908>.

2. Шершнев Е.С. Особенности подхода США к вопросам контроля качества продовольствия / Е.С. Шершнев, М.Л. Мамиконян, В.Г. Ларионов и др. // Пищевая промышленность. – 1998. – № 7. – С. 52–55.

3. Выявление остаточных количеств антибиотиков в мясе убойных животных и птицы / [Ю.А. Сосина, Е.А. Карцева, Е.И. Карамышева, Е.А. Ляшенко] // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. – 2012. – Вып. 6. – С. 178–180.

4. 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>.

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. 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>.

7. 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](http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/893/681/RUG01-001893681_2012_0001_AC.pdf).

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

9. 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.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО КОЛИЧЕСТВА МАКРОЛИДОВ И  $\beta$ -ЛАКТАМОВ В ПРОДУКЦИИ ПТИЦЕВОДСТВА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ / Гаркавенко Т.А., Азыркина И.М., Шалимова Л.О.**

*В статье приведены данные по апробации и валидации метода «NAT-screening» определение остаточного количества макролидов и  $\beta$ -лактамов в продукции птицеводства микробиологическим методом.*

*Определено специфичность, точность и чувствительность микробиологического метода «NAT-screening», который позволяет исследовать большое количество проб, требует минимального количества времени и расходных материалов и обеспечивает идентификацию остаточных количеств антимикробных препаратов к группе макролидов и  $\beta$ -лактамов.*

**Ключевые слова:** *тест-культура Kocuria rhizophila ATCC 9341, макролиды,  $\beta$ -лактамы, тилозин, мясо птицы, яйца, яичные продукты, NAT-screening.*

**DETERMINATION OF THE RESIDUAL AMOUNT OF MACROLIDES AND  $\beta$ -LACTAMS IN POULTRY PRODUCTS BY MICROBIOLOGICAL METHOD / Garkavenko T.A., Azyrkina I.M., Shalimova L.O.**

**Introduction.** *An urgent problem today remains the effective control of poultry products for the residual amounts of macrolides and  $\beta$ -lactams, as they able to get through the food chain to the human body, and cause overgrowth, toxemia, allergic reactions, secondary fungal infections, violation of mineral metabolism. They characterize as osteotropic and promote the development of antibiotic-resistant microorganisms in humans.*

**The goal of the work** *was to comparative the national and European microbiological screening methods for antibiotic residual in poultry meat and eggs; to conduct testing and validation of qualitative microbiological «NAT-screening» method of determination of macrolides and  $\beta$ -lactams in poultry, eggs and egg products.*

**Materialis and methods.** *Results are treated by variation statistics methods using «Microsoft Excel – 15.0» program with 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.*

**Results of research and discussion.** *We found clearly defined growth inhibition zone of pure test culture Kocuria rhizophila ATCC 9341, which ranged from  $17.01 \pm 0.01$  to  $20.03 \pm 0.03$  mm. The result of the study of microbiological «NAT-screening» method of small amounts of beta-lactams and macrolides residuals detection ( $1/2$  MRL) showed that this index for meat was 25 g/kg, for eggs and egg products – 50 mg/kg. Specificity, accuracy and sensitivity of test was 100%.*

**Conclusions and prospects for further research.** *Established that sensitivity of European microbiological method «NAT-screening» for residual amounts of macrolides and  $\beta$ -lactams for meat were: tylosin – 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , lincomycin – 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , tiamulin – 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , spiramycin – 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Tilmicosin – 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , erythromycin – 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ampicillin – 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , amoxicillin – 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cloxacillin – 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dicloxacillin – 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , oxacillin – 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; for eggs and egg products – erythromycin – 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , lincomycin – 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , tiamulin – 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , tylosin – 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  corresponding MDR European law and order №695 from 06.08.2013*

**Keywords:** *test culture, Kocuria rhizophila ATCC 9341, macrolides,  $\beta$ -lactams, tylosin, poultry, eggs, egg products, NAT-screening.*



REFERENCES

1. Stepna, O.O. Veterynarno-sanitarna otsinka produktiv ptakhivnystva pry asotsiyovanomu perebihu esherykhiozu i eymeriozu [Veterinary-evaluation of sanytarnaya of products pchelovodstva at assotsyyrovannom techenyy əsheryhyozu and eymeryozu]. *www.rero.sau.sumy.ua* Retrieved from <http://repo.sau.sumy.ua/handle/123456789/908> [in Ukrainian].
2. Shershnev, E.S., Mamykonyan, M.L. & Laryonov, V.H. (1998). Osobennosty podkhoda SShA k voprosam kontrolya kachestva prodovol'stvyaya [Features of the US approach to food quality control issues]. *Pyshchevaya promushlenost' – Food processing industry*, Vol 7, 52–55 [in Russian].
3. Sosyna, Yu.A., Kartseva, E.A., Karamysheva, E.Y. & Lyashenko, E.A. (2012). Vlyavlenye ostatochnykh kolychestv antybyotykov v myase uboynykh zhyvotnykh y ptytsey [Identification of residues of antibiotics in the meat of slaughtered animals and poultry]. *Aktual'nye problemy ynfektsyonnoy patolohyy y byotekhnolohyy – Actual problems of infectious pathology and biotechnology*, Vol 6, 178–180 [in Russian].
4. 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>.
5. 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 [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]. Order of the State Department of Veterinary Medicine №87 from 18.11.2003. *www.document.ua*. Retrieved from: <http://document.ua/obov'yakovii-minimalnii-perelik-doslidzhen-sirovini-produkciy-nor8259.html> [in Ukrainian].
6. Gondova, Zuzana (2012). 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>.
7. Nico, Coppens (2012). Microbial screening tests for antibiotic residues in meat: compared with the European technologies – Ghent university veterinary faculty. *www.lib.ugent.be*. Retrieved from: [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).
8. Commission Regulation (EU) № 37/2010. (2010). *Official journal of the European Commission*, 15, 72.
9. 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.