

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**АЗИРКІНА ІЛОНА МИХАЙЛІВНА**

УДК 636.09 : 578-07 : 614.31 : 615.33 : 637.5'65

**НАУКОВО-ПРАКТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ  
МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ  
АНТИБІОТИКІВ У ПРОДУКТАХ ПТАХІВНИЦТВА**

16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2021

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Роботу виконано в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно санітарної експертизи

**Науковий керівник** кандидат ветеринарних наук,  
старший науковий співробітник  
**Гаркавенко Тетяна Олександрівна,**  
Державний науково-дослідний інститут з  
лабораторної діагностики та  
ветеринарно-санітарної експертизи,  
перший заступник директора з наукового  
забезпечення керівництва випробувальним центром

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор  
**Якубчак Ольга Миколаївна,**  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
професор кафедри ветеринарної гігієни  
імені професора А. К. Скороходька

кандидат ветеринарних наук, доцент  
**Бусол Леся Володимирівна**  
Харківська державна зооветеринарна академія  
доцент кафедри ветеринарно-санітарної  
експертизи та судової ветеринарної медицини

Захист відбудеться «13» травня 2021 року о 13<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.14 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 309

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «12» квітня 2021 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

О. В. Журенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Гарантування безпечності та належної якості продуктів птахівництва є одним із найважливіших і пріоритетних завдань політики України (Коцюмбас І. Я., 2013; Якубчак О. М. 2018).

Питанню залишкового вмісту антибіотиків у харчових продуктах, зокрема, їхнього впливу на здоров'я людини й довкілля, приділяють значну увагу практично в усіх країнах Європи, Канаді та США (Kožířová I., 2018).

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO) більше половини всіх антибіотиків, які виробляються у світі, використовуються в птахівництві не для лікування, а для стимуляції росту (Sanz D. et al., 2015; Gondová Z. et al., 2015).

Необхідно зазначити, що з уведенням у країнах ЄС із 2006 року на застосування кормових антибіотиків у субтерапевтичних дозах для стимулювання росту тварин відбулося зростання кількості бактеріальних захворювань серед птиці та збільшилося використання антибіотиків у терапевтичних цілях. Це призвело до збільшення доз цих препаратів, недотримання технологічних регламентів використання та термінів каренції (Приліпко Т. М., 2013, Sanz D. et al., 2015; Wu Q. et al., 2019).

За вимогами вітчизняного законодавства, гармонізованого із європейським законодавством, у продуктах птахівництва необхідно визначати залишковий вміст антибіотиків таких груп: тетрациклінової,  $\beta$ -лактамів, макролідів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацинів.

У лабораторній практиці для визначення залишкового вмісту антибіотиків у харчових продуктах використовують мікробіологічний метод, імуноферментний та високоефективну рідинну хроматографію (Shahbazi Y. et al., 2016; Watkins H. S. et al., 2019). Мікробіологічні методики є простими у виконанні, дешевими і такими, що не потребують, на відміну від інших, використання вартісного обладнання та дорогих розхідних матеріалів (Gondová Z. et al., 2015).

Проте мікробіологічна методика, яку використовують українські лабораторії, дає можливість визначати залишковий вміст лише трьох антибіотиків, а саме, тетрацикліну, цинкбацитрацину та стрептоміцину (МВ 3049-84).

Тому перед нами постало завдання розробити та науково-практично обґрунтувати прості у використанні мікробіологічні методики визначення залишкового вмісту антибіотиків продуктах птахівництва, які регламентуються європейським і сучасним українським законодавством.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Матеріали дисертаційної роботи є частиною наукових досліджень Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ) (м. Київ) відповідно до наукових програм «Розробка, вивчення та порівняння різних методів і засобів ветеринарно-санітарної оцінки й контролю якості та безпеки продукції тваринного й рослинного походження та кормів» 2009 – 2018 рр. (№ державної реєстрації 0109U001082) та «Оцінка

ступеню поширення антибіотикорезистентності у збудників зоонозів в Україні» 2019 – 2028 рр. (№ державної реєстрації 0118U100599).

**Мета та завдання дослідження.** Мета роботи – науково-практичне обґрунтування застосування мікробіологічної методики визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва.

Для досягнення поставленої мети було передбачено вирішення таких завдань:

- підібрати тест-культури мікроорганізмів для визначення залишкового вмісту антибіотиків групи тетрациклінів, макролідів, β-лактамів, хінолонів, аміноглікозидів, бацитрацинів та визначити антибіотик – «маркер» групи;
- підібрати оптимальні поживні середовища для культивування відібраних тест-культур мікроорганізмів;
- підібрати буферні розчини та відпрацювати пробопідготовку для проведення досліджень мікробіологічною методикою визначення залишкового вмісту антибіотиків;
- визначити параметри проведення досліджень продуктів птахівництва мікробіологічною методикою щодо визначення залишкового вмісту антибіотиків;
- визначити чутливість, точність та специфічність розроблених методик;
- довести ефективність розроблених мікробіологічних методик щодо визначення залишкового вмісту антибіотиків у виробничих умовах;
- розробити науково-методичні рекомендації на розроблені методики та впровадити їх у лабораторну практику.

**Об'єкт дослідження** – науково-практичне обґрунтування застосування мікробіологічної методики визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва.

**Предмет дослідження** – продукти птахівництва (м'ясо, нирки, печінка, жир птиці та яйця), залишковий вміст антибіотиків, тетрацикліни, β-лактами та макроліди, аміноглікозиди, хінолони, бацитрацини, мікробіологічні методики.

**Методи дослідження:** мікробіологічні (мікроскопічний, культуральний), хроматомас-спектрометричні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше в Україні розроблено та науково-експериментально обґрунтовано застосування мікробіологічної методики щодо визначення залишків антибіотиків у продуктах птахівництва, яка базується на використанні специфічної (чутливої) до певної групи антибіотиків тест-культури мікроорганізму. На основі цього було розроблено 5 методик щодо визначення залишкового вмісту антибіотиків тетрациклінової групи, β-лактамів та макролідів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацинів; підібрано оптимальні параметри для проведення кожної із розроблених методик.

Підібрано специфічні (чутливі) тест-культури мікроорганізмів для розроблених методик: *Bacillus cereus* ATCC 11778 – для антибіотиків тетрациклінової групи, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 – для антибіотиків групи β-лактамів та макролідів; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – для групи аміноглікозидів; *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473) – для хінолонів та *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240 – до групи бацитрацинів.

Експериментально обґрунтовано оптимальні за хімічним складом та величиною рН поживні середовища для відібраних тест-культур мікроорганізмів.

Уперше в Україні визначено антибіотик – «маркер групи»: для тетрациклінів – окситетрациклін (0,06 мкг/см<sup>3</sup>); для β-лактамів та макролідів – тилозин (0,05 мкг/см<sup>3</sup>); для аміноглікозидів – дигідрострептоміцин (0,05 мкг/см<sup>3</sup>); для хінолонів – флюмеквін (0,04 мкг/см<sup>3</sup>); для групи бацитрацинів – цинкбацитрацин (0,05 мкг/см<sup>3</sup>).

Запропонована підготовка проб продуктів птахівництва для розроблених мікробіологічних методик без використання специфічного лабораторного обладнання (центрифуги, водяної бані) дає змогу покращити екстракцію залишкового вмісту антибіотика із проби в буферний розчин, а також скоротити затрати часу для дослідження та кількість використаного буферного розчину.

Науково доведено, що специфічність та точність розроблених мікробіологічних методик для визначення залишкового вмісту антибіотиків складає 98 %. Чутливість методик відповідає вимогам, які висуваються до скринінгових методик та дає можливість визначити залишковий уміст 6 груп антибіотиків на рівнях, які регламентуються європейським та національним законодавством для продуктів птахівництва (м'яса птиці, нирок, печінки, жиру птиці та яєць). Зокрема встановлено, що чутливість методу: для визначення залишкового вмісту антибіотиків тетрациклінової групи в м'ясі птиці, нирок становить 50 мкг/кг; для яєць – 100 мкг/кг; для жиру та печінки – 150 мкг/кг; для визначення залишкового вмісту антибіотиків групи макролідів та β-лактамів: для м'яса птиці, жиру, нирок, печінки – 25 мкг/кг; та 50 мкг/кг для яєць; для визначення залишкового вмісту антибіотиків групи аміноглікозидів: для м'яса птиці, жиру, шкіри – 50 мкг/кг; для нирок – 500 мкг/кг; для печінки – 300 мкг/кг, у яйцях – 250 мкг/кг; для визначення залишкового вмісту антибіотиків групи хінолонів – для м'яса птиці, нирок, печінки 50 мкг/кг; для антибіотиків енрофлосацину та оксолінової кислоти – для печінки та нирок – 75 мкг/кг; для визначення залишкового вмісту антибіотиків групи бацитрацинів – для м'яса, печінки, нирок – 10 мкг/кг.

Підтверджено 100 % узгодженість результатів досліджень, отриманих за використання розроблених нами мікробіологічних методик визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва та референтного методу рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (РХ-МС/МС) та дають змогу визначити залишковий уміст антибіотиків на рівні ½ встановлених нормативно-правовими актами МДР, тому можуть бути використані для цілей державного контролю.

Наукову новизну виконаної роботи підтверджено деклараційними патентами України на корисну модель «Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи в продукції птахівництва мікробіологічним методом»; «Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи в яйцях та яєчних продуктах мікробіологічним методом»; «Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи макролідів та β-лактамів у продуктах забою птиці

мікробіологічним методом»; «Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи макролідів та  $\beta$ -лактамів у яйцях та яєчних продуктах мікробіологічним методом»; «Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи аміноглікозидів у яйцях та яєчних продуктах мікробіологічним методом»; «Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи аміноглікозидів у продуктах забою птиці мікробіологічним методом»; «Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи хінолонів у продуктах забою птиці мікробіологічним методом»; «Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи бацитрацинів у продуктах забою птиці мікробіологічним методом».

**Практичне значення одержаних результатів.** Практична цінність роботи полягає у впровадженні в лабораторну практику методик визначення залишкового вмісту антибіотиків у м'ясі, нирках, печінці, жирі птиці та яйцях) різних груп у лабораторну діагностику Херсонської регіональної державної лабораторії ім. професора Л. С. Ценковського Держпродспоживслужби, регіональної, державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області, Тернопільської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби, Івано-Франківської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби.

Для практичного впровадження розроблених нами методик визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва розроблені такі методичні вказівки та рекомендації: «Морфологічна характеристика та культивування тест-культур мікроорганізмів, що рекомендуються для випробувань на залишковий вміст антибіотиків та антимікробних речовин мікробіологічним методом» (*затверджені науково-методичною радою Держпродспоживслужби, 25.12.2014 р. протокол № 1*); «Визначення мікробіологічним скринінг-методом залишкових кількостей антибіотиків групи аміноглікозидів у м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах», «Методичні рекомендації. Визначення мікробіологічним скринінг-методом залишкових кількостей антибіотиків групи  $\beta$ -лактамів та макролідів у м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах», «Методичні рекомендації. Визначення мікробіологічним скринінг-методом залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи у м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах», «Методичні рекомендації. Визначення мікробіологічним скринінг-методом залишкових кількостей антибіотиків групи хінолонів у м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах» (*затверджені науково-методичною радою Держпродспоживслужби 20.12.2018 р, протокол № 3*), що дало можливість розширити мережу лабораторій із визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва для цілей державного контролю.

Впровадження в лабораторну практику вищезазначених методичних рекомендацій надають можливість розширити перелік антибіотиків, залишковий вміст яких може бути визначений продуктах птахівництва, розширити мережу лабораторій, здатних проводити ці дослідження, скоротити час проведення досліджень та кількість розхідних матеріалів, які використовуються в роботі.

Методики акредитовані відповідно до вимог ДСТУ ISO/EC 17025:2017 (атестат акредитації № 20489 в Національному агентстві акредитації України).

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем самостійно проведено пошук та аналіз фахової літератури, відбір проб, проведення експериментальних досліджень із визначення залишкового вмісту антибіотиків у м'ясі, нирках, печінці, жирі птиці та яйцях, обробка та теоретичне обґрунтування результатів, підготовка матеріалів до публікації в наукових виданнях. Планування досліджень та розроблення методичних підходів, патентів, аналіз і обговорення результатів та формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником.

**Апробація результатів дослідження дисертації.** Основні положення дисертації доповідалися, обговорювалися та отримали загальне схвалення на щорічних звітних сесіях вченої ради ДНДІЛДВСЕ впродовж 2015–2020 рр., доповідалися та обговорювалися на науково-практичних конференціях: IV Міжнародній науково-практичній конференції «Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів», присвяченої 100 річчю з Дня народження Ю. П. Сміяна (м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Building Ukraine's One Health and Biosurveillance Knowledgebase Through the Dissemination of Scientific Findings» (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Біобезпека у тваринництві і птахівництві: проблеми та їх рішення» (м. Миколаїв, 2016 р.); Науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2016 р.); V науково-практичній конференції «Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів» (м. Київ, 2016 р.), VI науково-практичній конференції «Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів» (м. Київ, 2017р.); Всеукраїнських семінарах бактеріологів «Сучасні підходи до вирішення проблеми антибіотикорезистентності мікроорганізмів; Програми державного ветеринарно-санітарного контролю сальмонельозу птиці в птахогосподарствах України» (м. Івано-Франківськ, 2018р.) та «Сучасні мікробіологічні методи дослідження щодо збудників зоонозів» (м. Бердянськ, 2019 р.); навчальному семінарі для фахівців підприємств, які беруть участь у підтвердженні вирощування птиці та отримання продукції птахівництва без використання антимікробних засобів та/або без їх залишків (м. Київ, 2020 р.).

**Публікації.** Результати досліджень опубліковано в 25 наукових працях, з яких 9 статей у наукових фахових виданнях України, стаття у наукових виданнях інших держав, 8 патентів України на корисну модель; 5 науково-методичних рекомендацій, 2 тези наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків і пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації викладено на 200 сторінках, робота

ілюстрована 48 таблицями, 10 рисунками, додатками. Список використаної літератури нараховує 288 джерела, з них 165 – латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота та лабораторні дослідження виконувалася в лабораторії мікробіологічних досліджень харчових продуктів та кормів науково-дослідного бактеріологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно санітарної експертизи упродовж 2014 – 2020 рр.

Постановку експериментальних досліджень проводили за розробленою схемою (рис. 1).

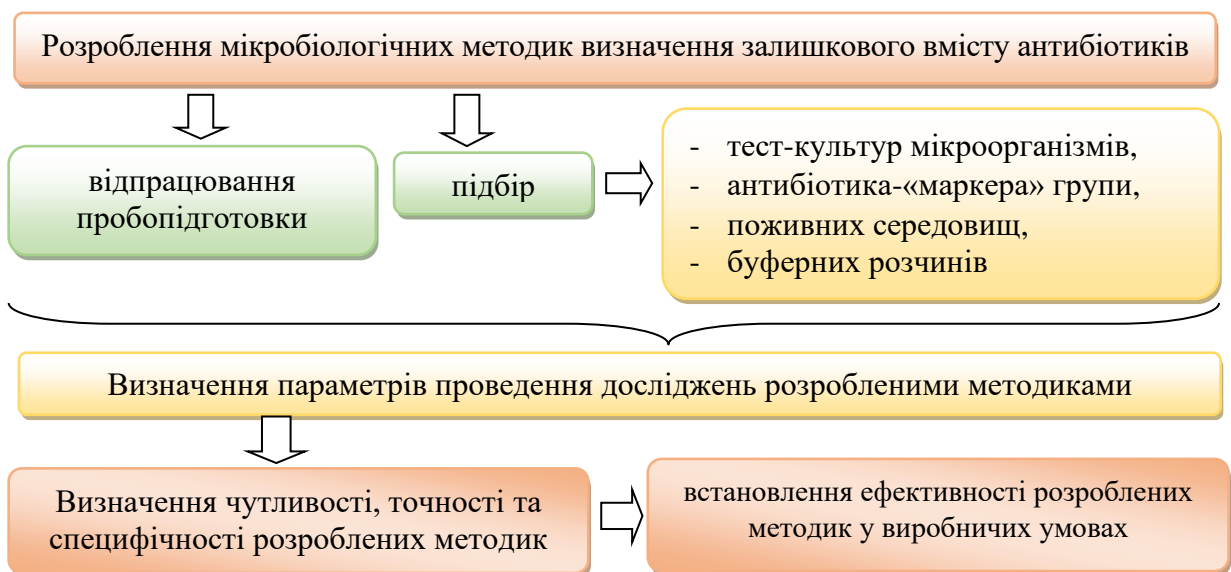


Рис.1 Загальна схема проведення експериментальних досліджень

### В експериментальних дослідженнях використано:

– **штами мікроорганізмів** *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Bacillus cereus (var. Mycoides)* НВ, *Bacillus subtilis* L<sub>2</sub>, *Escherichia coli* ATCC 11303, *Bacillus mycoides* ATCC 537. Всі штами зберігаються в музеї науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ. Морфологічну характеристику та біохімічні властивості тест-культур мікроорганізмів перевіряли загальноприйнятими мікробіологічними методиками згідно з ДСТУ ISO 11133:2016, ДСТУ ISO 7218:2014 за паспортними даними;

– **диски антибіотиків**: хлортетрациклін (30 мкг), окситетрациклін (30 мкг), доксициклін гідрохлорид (30 мкг), тетрациклін (30 мкг), лінкоміцин (10 мкг), еритроміцин (15 мкг), ампіцилін (10 мкг), амоксицилін (10 мкг), клоксацилін (5 мкг), оксацилін (1 мкг), неоміцин (30 мкг), енрофлоксацин (10 мкг), бацитрацин (10 мкг) виробництва Himedia (Індія).



Для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків використовували диско-дифузійний метод Кірби-Бауера;

– **сертифіковані стандарти антибіотиків:** хлорамфенікол 1000 мкг/см<sup>3</sup>, окситетрациклін 0,6 мкг/см<sup>3</sup>, тилозин 0,5 мкг/см<sup>3</sup>, дигідрострептоміцин 0,5 мкг/см<sup>3</sup>, флюмеквін 0,4 мкг/см<sup>3</sup>, цинкбацитрацин 0,2 мкг/см<sup>3</sup> виробника Sigma Aldrich (США).

Активність антибіотиків визначали через порівняння ступеня пригнічення росту чутливих тест-культур мікроорганізмів і взаємодії зі стандартним розчином антимікробного препарату у відомих концентраціях відповідно до Державної фармакопеї України, I вид., 2001 року (біологічні методи кількісного визначення, 2.7.2 Кількісне визначення антибіотиків мікробіологічним методом);

– **поживні середовища:** 2 % м'ясо-пептонний агар (рН 6,5, рН 7,0, рН 7,9), Мюллера-Хінтона (рН 6,0, рН 6,5, рН 7,0), Iso-sensitest agar (рН 6,0, рН 6,5, рН 7,0, рН 8,0), Plate count agar (рН 6,0, рН 6,5, рН 7,0, рН 8,0), поживне середовище № 3 рН 6,4 (20,0 г агару мікробіологічного, 200 см<sup>3</sup> бульйона Хотингера 100 % аміно-аміачного азоту – 1000 см<sup>3</sup>, 1,0 г глюкози кристалічної) (МР 3049–84), поживне середовище №4 рН 6,1 (25,0 г агару мікробіологічного, бульйон Хотингера 33 мг % –1000 см<sup>3</sup>) (МР 3049–84) поживне середовище № 6 рН 6,7 (10,0 г пептону, 5,0 г натрію хлористого, 7,5 г м'ясного екстракту 20,0 г агару мікробіологічного) (МР 3049–84), поживне середовище № 7 рН 6,5 (6,0 г пептону, 4,0 г панкреатичного гідралізату казеїну, сухого, 3,0 г дріжджового екстракту, 1,5 г м'ясного екстракту, 20,0 г агару мікробіологічного, 1,0 г глюкози кристалічної) (МР 3049–84), триптон-соєвий агар рН 7,0. Компоненти поживних середовищ використовували виробництва Himedia, Індія.

Виготовлення поживних середовищ та перевірку їх за ростовими властивостями проводили згідно з інструкціями виробника та ДСТУ ISO 11133:2016;

– **буферні розчини:** 0,1 М та 1,5 М фосфатний, Tris buffer виробництва EMD Milipore Corp. Billerica, MA (США);

– **паперові диски** 597 filter paper circles діаметром 12,7 мм виробництва Whatman (Німеччина);

– **продукти птахівництва.** У дослідженнях використовували: м'ясо птиці (курятина), жир, печінка, нирки, яйця.

Чутливість, точність та специфічність розроблених методів проводили згідно з ДСТУ ISO 16140 : 2006, Рішення Комісії 2002/657/ЕС.

Ефективність розроблених мікробіологічних методик щодо визначення залишкового вмісту антибіотиків проводили – порівнюючи їх із референтним методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (РХ-МС/МС). Для дослідження застосовували обладнання фірми Varian 1200L LC/MS (США) з тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором, з колонкою SunFire™ C18 (3,5 μm, 2,1x100 mm) із передколonoю SunFire™ C18 (3,5 μm, 2,1x10 mm) фірми Waters (США).

Перший експеримент проводили в лабораторних умовах із використанням проб м'яса птиці по 20 негативних та 20 з добавкою аналіту: канаміцину, тилозину, енрофлоксацину, окситетрацикліну з умістом 100 мкг/кг.

Другий експеримент проводили на 20 курах-несучках породи Леггорн, віком 35 тижнів на піку яйцекладки (90 %), живою масою до 2 кг. Утримували курей у клітках у віварії. Курей розділяли на контрольну та дослідну групи в кожній по 10 голів. Дослідній групі випоювали з водою доксициклін у терапевтичній дозі (100 мг/кг) упродовж 7 діб, друга контрольна група курей-несучок утримувалася на основному раціоні за тих же умов без застосування антибіотиків (контрольна). Дослідження яєць від обох груп курей-несучок проводили впродовж 21 доби розробленими мікробіологічними методами та методом РХ-МС/МС.

Під час роботи з дослідною птицею керувалися вимогами українського міжнародного комітету з питань науки і культури при національній академії наук України вимогами статті 26 закону України про захист тварин від жорстокого поводження, а також Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1985) та ухвалою першого Національного Конгресу з біоетики (м. Київ, 2001).

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

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Підбір тест-культур мікроорганізмів для визначення певних груп антибіотиків, підбір антибіотику-«маркера» групи.** Для розробки мікробіологічних методик визначення залишкового вмісту антибіотиків групи  $\beta$ -лактамів, макролідів, тетрациклінів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацину кожну рекомендовану Державною фармакопесєю України культуру досліджували диско-дифузійним методом на чутливість до всіх видів антибіотиків певної групи. Водночас звертали увагу на наявність чіткої зони інгібування росту культури, діаметром понад 15 мм навколо кожного диску з антибіотиком та відсутність поодиноких колоній культури в зоні інгібування.

За аналізом отриманих результатів досліджень встановлено, що тест-культура *Bacillus cereus* ATCC 11778 проявляла чутливість до всіх антибіотиків тетрациклінової групи. Антибіотиковим маркером (позитивним контролем) для визначення залишкового вмісту антибіотиків групи тетрацикліну було визначено окситетрациклін, що давав найменшу зону інгібування росту ( $17,1 \pm 0,07$  мм).

Встановлено, що тест-культура *Kocuria rhizophila* (*Sarcina lutea*) ATCC 9341 виявилася найбільш чутлива до всіх використаних у досліді антибіотиків групи макролідів. Ця ж культура виявилася найчутливішою до

всіх антибіотиків групи  $\beta$ -лактамів. Оскільки тилозин давав найменшу зону інгібування росту ( $18,25 \pm 0,1$  мм), у подальших дослідженнях його використовували як позитивний контроль для визначення залишкового вмісту антибіотиків двох груп (макролідів та  $\beta$ -лактамів).

Щодо групи аміноглікозидів, то найчутливішою до цієї групи антибіотиків виявилася тест-культура *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Між тим дигідрострептоміцин давав найменш чітку зону інгібування ( $17,2 \pm 0,1$  мм), тому в подальших дослідженнях його використовували як позитивний контроль.

За результатами досліджень встановлено, що тест-культура *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473) була найбільш чутливою до групи хінолонів, а флюмеквін, який давав найменшу, але репрезентативну зону інгібування росту ( $14,9 \pm 0,1$  мм), було обрано як антибіотиковий маркер.

Встановлено, що тест-культура *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240 виявилася найбільш чутлива до бацитрацину. Цинкбацитрацин із зоною інгібування росту ( $17,5 \pm 0,1$  мм) було обрано у якості позитивного контролю для визначення залишкового вмісту цієї групи антибіотиків.

**Підбір оптимальних поживних середовищ для тест-культур мікроорганізмів.** Принцип розроблених методик полягає в здатності антибіотика із проби дифундувати в агар, тому за його наявності чутлива до цієї групи антибіотиків тест-культура не росте на поживному середовищі з утворенням зони інгібування, тому для уникнення хибнопозитивних результатів (бідного росту), було здійснено підбір оптимальних поживних середовищ для кожної із відібраних тест-культур мікроорганізмів, які б забезпечували інтенсивний ріст культури на поживному середовищі у вигляді суцільного газону.

Нами було апробовано 5 видів поживних середовищ із різною величиною показника рН.

Встановлено, що для вирощування тест-культур *Bacillus cereus* ATCC 11778 найліпшими за хімічним складом та величиною величиною рН виявилися поживні середовища Мюллера-Хінтона та Iso-sensitest agar з величиною рН 6,0, для *Kocuria rhizophila (Sarcina lutea)* ATCC 9341 – поживне середовище Iso-sensitest agar з величиною рН 8,0. Для росту тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633 найоптимальнішими за складом виявилися поживне середовище Plate count agar з величиною рН 8,0, для *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473) – Plate count agar із величиною рН 6,5, а для *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240 поживне середовище Iso-sensitest agar із величиною рН 7,0.

**Підбір буферних розчинів та відпрацювання пробопідготовки для проведення досліджень продуктів птахівництва мікробіологічними методиками щодо визначення залишкового вмісту антибіотиків.** Для відпрацювання екстракції залишкового вмісту антибіотиків із проби в буферний розчин (цитратно-солянокислий та 0,1 М фосфатний буферний розчин) порівняли три методи пробопідготовки:

– згідно з Методичними вказівками № 3049–84 від 1984 р. – проводили гомогенізацію м'яса або прогрівання яєць, зважування, додавали буферний розчин, інкубували в термостаті, прогрівали на водяній бані, центрифугували; розводили буферним розчином супернатант; затрачений час на пробопідготовку склав 150 хв.;

– згідно з європейською методикою відбирали проби свіжого м'яса. Для цього поверхню м'яса вирівнювали скальпелем, стерильним коркобором виймали з кожної проби циліндричні виїмки, діаметром 8 мм і завдовжки 2 см, знімали м'ясо й за допомогою ланцета вирізали з кожної проби по 8 кружків, товщиною 2 мм. Користуючись пінцетом накладали по 2 диски один проти одного в чашки з поживним середовищем. На пробопідготовку затрачено 35 хв.;

– згідно з нашою методикою поверхню проб м'яса вирівнювали, робили поперечні надрізи скальпелем та вкладали в них диски з фільтрувального паперу на 30 хв для просочування рідиною проби. Для дослідження яєць відбирали жовток, яким просочували такі ж диски з фільтрувального паперу впродовж 30 хв. Після цього диски поміщали в буферний розчин, який попередньо вносили в луночки із поживним середовищем; затрачено на пробопідготовку 10 хв.

Провівши порівняльні дослідження проб м'яса із додаванням антибіотику тетрациклінової групи в концентрації  $\frac{1}{2}$  встановленого максимально допустимого рівня (10 мкг/кг) із використанням підготовки проб до дослідження згідно з Методичними вказівками № 3049–84 від 1984 р. та нашою методикою. Водночас одержано ідентичні результати. Тест-культура *Bacillus cereus* ATCC 11778 дала зони затримки росту, величина яких вказували на наявність залишкового вмісту тетрацикліну. Щодо європейської методики, то спостерігали відсутність зон інгібування росту тест-культури *Bacillus cereus* ATCC 11778, тобто ця методика не забезпечувала виявлення залишкового вмісту тетрацикліну в досліджуваних пробах.

Встановлено, що запропонована нами пробопідготовка дозволила покращити екстракцію залишкового вмісту антибіотика із проби в буферний розчин, а також скоротити затрати часу для дослідження, кількість використаного для готування проби буферного розчину, виключила використання спеціального лабораторного обладнання: термостату, водяної бані, центрифуги.

**Визначення параметрів режиму культивування.** Нами були підібрані оптимальні режими культивування для кожної тест-культури для розроблених мікробіологічних методик, які зазначені в табл.1, та відпрацьовані параметри для оцінки результатів дослідження.

Особливу увагу приділяли контролю (диску, просоченому стандартом антибіотику): навколо цього диску повинні бути чітко окреслені, чисті від росту тест-культури зони інгібування, діаметром  $\geq 15$  мм (1 мм від луночки).

За негативні результати приймали проби, навколо дисків із рідиною проби яких спостерігали суцільний ріст тест-культур або діаметр зон інгібування росту цих культур  $\leq 14$  мм.

**Параметри лабораторних досліджень з визначення залишкового вмісту антибіотиків різних груп у продуктах птахівництва мікробіологічними методами**

Група антибіотиків	Тест-культура мікроорганізму	Назва поживного середовища, рН	Назва буферного розчину, рН	Назва антибіотика-маркера, концентрація	Температура інкубації, °С
Тетрацик-лінова	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 – 1,7 MF 100 мкл + Хлорамфенікол 1000 мкг/см <sup>3</sup> – 62,5 мкл	Iso-sensitest agar, 6,0	0,1 М фосфатний, 6,0	Окситетрациклін 0,6 мкг/см <sup>3</sup> (0,06 мкг/см <sup>3</sup> )	30
β-лактами +макроліди	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 –1,7 MF 200 мкл	Iso-sensitest agar, 8,0	1,5 М фосфатний, 8,0	Тилозин 0,5 мкг/см <sup>3</sup> (0,05 мкг/см <sup>3</sup> )	37
Аміноглі-ко-зиди	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 – 1,7 MF 100 мкл	Plate count agar, 8,0	Tris buffer, 8,5	Дигідро-стрептоміцин 0,5 мкг/см <sup>3</sup> (0,05 мкг/см <sup>3</sup> )	37
Хінолони	<i>Yersinia ruckeri</i> NCIM 13282 (ATCC 29473) 1,7 MF 200 мкл	Plate count agar, 6,5	0,1 М фосфатний, 6,5	Флюмеквін 0,4 мкг/см <sup>3</sup> (0,04 мкг/см <sup>3</sup> )	30
Бацитрацин	<i>Micrococcus luteus (flavus)</i> ATCC 10240 –1,7 MF 200 мкл	Iso-sensitest agar, 7,0	1,5 М фосфатний, 7,0	Цинкбацитрацин 0,5 мкг/см <sup>3</sup> (0,05 мкг/см <sup>3</sup> )	37

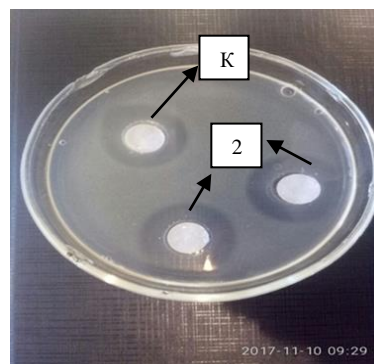
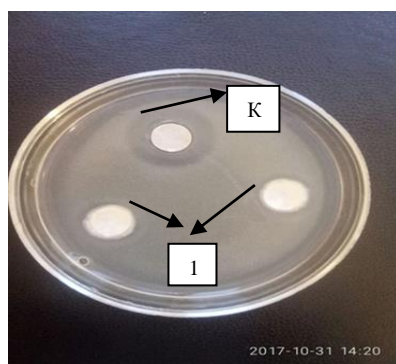


Рис. 2 Візуалізація результатів дослідження на прикладі проб м'яса птиці на залишковий вміст антибіотиків мікробіологічними методиками

Примітка. К – диск, просочений стандартом антибіотика (позитивний контроль); 1 - позитивний результат (наявність залишкового вмісту антибіотика у пробі); 2 - негативний результат (відсутність залишкового вмісту антибіотика у пробі).

За позитивний результат (залишковий уміст антибіотиків) приймали проби, навколо дисків яких спостерігали чітко окреслені зони інгібування, діаметром  $\geq 15$  мм (рис. 2).

**Визначення чутливості, точності та специфічності розроблених мікробіологічних методик.** Дослідження м'яса, жиру, печінки, нирок, яєць проводили на 20 негативних та 20 позитивних пробах, насичених аналітом (антибіотиками відповідних груп) у концентрації, яка дорівнювала  $\frac{1}{2}$  встановленого максимально допустимого рівня.

Аналіз одержаних даних, дослідження проб м'яса, насичених аналітом – окситетрацикліном на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР, виявили, що зони інгібування тест-культури *Bacillus cereus* ATCC 11778 мали найнижчі показники та становили ( $17,04 \pm 0,03$  мм), а найвищі зони затримки росту – ( $19,03 \pm 0,02$  мм) спостерігали навколо дисків, просочених розчином антибіотика із додаванням тетрацикліну на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР (табл. 2).

Таблиця 2

**Виявлення залишкового вмісту антибіотиків тетрациклінової групи за показниками затримки росту тест-культури *Bacillus cereus* ATCC 11778,  $M \pm m$ , мм,  $n=20$**

Назва антибіотиків	Діаметри зон затримки росту (мм) навколо проб, модельованих антибіотиком на рівні $\frac{1}{2}$ МДР				
	м'ясо	яйця (жовток)	печінка	нирки	жир
окситетрациклін	$17,04 \pm 0,03^*$	$18,03 \pm 0,02^*$	$19,03 \pm 0,03^*$	$20,05 \pm 0,03^*$	$17,03 \pm 0,03^*$
тетрациклін	$19,03 \pm 0,02^*$	$18,01 \pm 0,01^*$	$18,05 \pm 0,03^*$	$20,03 \pm 0,03^*$	–
доксидиклін	$18,04 \pm 0,03^*$	$19,03 \pm 0,02^*$	$19,03 \pm 0,02^*$	$20,03 \pm 0,03^*$	$18,03 \pm 0,03^*$
хлортетрациклін	$18,03 \pm 0,03^*$	$17,03 \pm 0,02^*$	$19,05 \pm 0,03^*$	$20,03 \pm 0,03^*$	–

Примітка. \*  $p \leq 0,05$ ; порівняно із величиною діаметра зон затримки росту навколо лунок із стандартним розчином окситетрациклін  $18,0 \pm 0,05$  мм

У пробах яєць (жовтка) найнижчі зони затримки росту були навколо проб із додаванням хлортетрацикліну на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР ( $17,03 \pm 0,02$  мм), найвищі ж зони затримки росту були навколо проб із доксицикліном ( $19,03 \pm 0,02$  мм), який був додано в проби на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР.

Під час досліджень проб м'яса із додаванням клоксациліну на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР спостерігали найнижчі зони затримки росту тест-культури *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 ( $17,01 \pm 0,01$  мм) та найвищі зони затримки росту ( $18,03 \pm 0,03$  мм), які отримані навколо дисків, просочених розчином антибіотика м'яса із додаванням тіаμουліну, еритроміцину, тилмікозину на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР (табл. 3).

У пробах яєць (жовтка) найнижчі зони затримки росту тест-культури *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 виявлені навколо проб із додаванням еритроміцину на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР ( $18,01 \pm 0,01$  мм), а найвищі зони затримки росту спостерігалися навколо дисків, просочених лінкоміцином, тіамуліном, тілозином на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР ( $18,03 \pm 0,02$  мм) (табл. 3).

За дослідження проб м'яса з аналітом – канаміцином на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР зазначили найнижчі зони інгібування тест-культура *Bac. subtilis* ATCC 6633, які

становили  $17,01 \pm 0,01$  мм, а найвищі зони ( $18,05 \pm 0,03$  мм) спостерігали навколо дисків, просочених проб із додаванням неоміцину на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР.

Таблиця 3

**Виявлення залишкового вмісту антибіотиків групи макролідів та  $\beta$ -лактамів за показниками затримки росту тест-культури *Kocuria rhizophila* АТСС 9341,  $M \pm m$ , мм,  $n=20$**

Назва антибіотиків	Діаметри зон затримки росту (мм) навколо проб, модельованих антибіотиком на рівні $\frac{1}{2}$ МДР				
	м'ясо	яйця (жовток)	печінка	нирки	жир
Ампіцилін	$17,03 \pm 0,01^*$	–	$19,05 \pm 0,03^*$	$20,05 \pm 0,03^*$	$18,05 \pm 0,03^*$
Амоксицилін	$17,03 \pm 0,02^*$	–	$17,01 \pm 0,01^*$	$20,05 \pm 0,03^*$	$18,05 \pm 0,03^*$
Клоксацилін	$17,01 \pm 0,01^*$	–	$17,03 \pm 0,03^*$	$18,01 \pm 0,01^*$	$17,03 \pm 0,03^*$
Діфлюксацилін	$17,03 \pm 0,03^*$	–	$17,03 \pm 0,03^*$	$18,01 \pm 0,01^*$	$17,03 \pm 0,05^*$
Оксацилін	$17,03 \pm 0,03^*$	–	$17,03 \pm 0,03^*$	$17,03 \pm 0,03^*$	$17,03 \pm 0,05^*$
Тилозин	$18,01 \pm 0,01^*$	$18,03 \pm 0,02^*$	$18,05 \pm 0,03^*$	$20,05 \pm 0,03^*$	$18,05 \pm 0,03^*$
Лінкоміцин	$18,01 \pm 0,01^*$	$18,03 \pm 0,02^*$	$18,03 \pm 0,03^*$	$18,03 \pm 0,03^*$	$18,05 \pm 0,03^*$
Тіамулін	$18,03 \pm 0,03^*$	$18,03 \pm 0,02^*$	$18,08 \pm 0,04^*$	–	$18,03 \pm 0,05^*$
Спіраміцин	$18,01 \pm 0,01^*$	–	$18,05 \pm 0,03^*$	–	$18,05 \pm 0,03^*$
Тілмікозин	$18,03 \pm 0,03^*$	–	$18,03 \pm 0,03^*$	$18,05 \pm 0,03^*$	$18,05 \pm 0,03^*$
Еритроміцин	$18,03 \pm 0,02^*$	$18,01 \pm 0,01^*$	$18,1 \pm 0,05^*$	$20,03 \pm 0,03^*$	$18,03 \pm 0,02^*$

Примітка. \*  $p \leq 0,05$ ; порівняно з величиною діаметра зон затримки росту навколо лунок зі стандартним розчином тилозин  $17,03 \pm 0,03$  мм

Таблиця 4

**Виявлення залишкового вмісту антибіотиків групи аміноглікозидів за показниками затримки росту тест-культури *Bacillus subtilis* АТСС 6633,  $M \pm m$ , мм,  $n=20$**

Назва антибіотиків	Діаметри зон затримки росту (мм) навколо проб, модельованих антибіотиком на рівні $\frac{1}{2}$ МДР				
	м'ясо	яйця (жовток)	печінка	нирки	жир
Парамоміцин	$18,01 \pm 0,01^*$	–	$19,08 \pm 0,04^*$	$19,05 \pm 0,03^*$	–
Дигідрострептоміцин	$18,01 \pm 0,02^*$	–	$18,05 \pm 0,03^*$	$18,05 \pm 0,03^*$	$18,08 \pm 0,04^*$
Канаміцин	$17,01 \pm 0,01^*$	–	$17,01 \pm 0,01^*$	$17,05 \pm 0,03^*$	$17,03 \pm 0,03^*$
Неоміцин	$18,05 \pm 0,03^*$	$18,04 \pm 0,03^*$	$18,03 \pm 0,03^*$	$18,05 \pm 0,03^*$	$18,08 \pm 0,04^*$

Примітка. \*  $p \leq 0,05$ ; порівняно з величиною діаметра зон затримки росту навколо лунок зі стандартним розчином дигідрострептоміцин  $17,05 \pm 0,03$  мм

Щодо проб яєць (жовтка), насичених неоміцином, то найнижчі зони затримки росту тест-культури ( $18,04 \pm 0,03$  мм) були навколо проб із додаванням цього антибіотику в дозі  $\frac{1}{2}$  МДР (табл. 4).

За аналізу результатів дослідження з визначення залишкового вмісту антибіотиків групи хінолонів встановлено, що навколо проб м'яса із додаванням на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР енрофлоксацину, флюмеквіну тест-культура *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (АТСС 29473) проявляла відповідно найнижчі зони інгібування ( $17,03 \pm 0,01$  мм та  $17,03 \pm 0,02$  мм). Найвищі ж зони ( $18,05 \pm 0,03$  мм) виявлені навколо дисків, просочених рідиною антибіотика із додаванням оксолінової кислоти на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР (табл. 5).

Таблиця 5

**Виявлення залишкового умісту антибіотиків групи хінолонів  
за показниками затримки росту тест-культури *Yersinia ruckeri* NCIM 13282  
(ATCC 29473),  $M \pm m$ , мм,  $n=20$**

Назва антибіотиків	Діаметри зон затримки росту (мм) навколо проб, модельованих антибіотиком на рівні ½ МДР		
	м'ясо	печінка	нирки
Данофлорксацин	18,01 ± 0,01*	18,01 ± 0,01*	18,04 ± 0,02*
Діфлорксацин	18,01 ± 0,01*	18,01 ± 0,01*	18,03 ± 0,02*
Енрофлорксацин	17,03 ± 0,01*	17,04 ± 0,03*	18,04 ± 0,03*
Флюмеквін	17,03 ± 0,02*	17,03 ± 0,03*	18,01 ± 0,01*
Оксолінова кислота	19,03 ± 0,03*	17,04 ± 0,03*	18,04 ± 0,02*

Примітка. \*  $p \leq 0,05$ ; порівняно з величиною діаметра зон затримки росту навколо лунок зі стандартним розчином флюмеквін 17,01 ± 0,01 мм

У разі додавання до проб м'яса птиці бацитрацину на рівні ½ МДР зони інгібування *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240 в середньому становили 18,09 ± 0,05 мм (табл. 6).

Таблиця 6

**Виявлення залишкового вмісту антибіотиків групи бацитрацинів  
за показниками затримки росту тест-культури  
*Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240,  $M \pm m$ , мм,  $n=20$**

Назва антибіотиків	Діаметри зон затримки росту (мм) навколо проб, модельованих антибіотиком на рівні ½ МДР		
	м'ясо	печінка	нирки
Бацитрацин	18,075 ± 0,04*	19,05 ± 0,03*	19,08 ± 0,04*

Примітка. \*  $p \leq 0,05$ ; порівняно з величиною діаметра зон затримки росту навколо лунок зі стандартним розчином цинкбацитрацин 18,05 ± 0,03 мм

Навколо лунок із дисками, просякнутими екстрагованою рідиною проб м'яса без додавання антибіотиків в усіх випадках спостерігали суцільний ріст відповідних тест-культур.

Аналогічні результати – утворення репрезентативних зон інгібування росту тест-культур, були отримані за різними видами продуктів птахівництва (м'ясо, печінка, нирки, жир, яйця) за всіма досліджуваними пробами, у які додавалися ці ж антибіотики на рівні 1 МДР, у результаті чого було визначено чутливість розроблених мікробіологічних методик щодо визначення залишкового вмісту антибіотиків груп β-лактамів, макролідів, тетрациклінів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацину для м'яса птиці, жиру, печінки, нирок, яєць.

Встановлено, що точність розроблених методик, становила 98 %, а узгодженість між результатами досліджень та пробами із різним додаванням та рівнями внесеного аналізу досягала 97 %.

**Ефективність розроблених мікробіологічних методик.** Ця частина досліду була спрямована на підтвердження чутливості розроблених нами мікробіологічних методик визначення залишкового вмісту антибіотиків групи тетрациклінів, макролідів, β-лактамів, хінолонів, аміноглікозидів у м'ясі птиці



референтним методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (РХ-МС/МС) у лабораторних умовах. Для цього модельовані проби м'яса птиці із додаванням аналітів: канаміцину, тилозину, енрофлоксацину, окситетрацикліну – на рівні  $\frac{1}{2}$  МДР та на рівні МДР досліджувалися паралельно двома методами (табл. 7).

Таблиця 7

**Показники визначення залишкового вмісту антибіотиків в пробах м'яса птиці методом РХ-МС/МС та мікробіологічним методом,  $n=10$**

Проби м'яса	РХ-МС/МС				Скринінгова мікробіологічна методика			
	мкг/кг				діаметр зони затримки росту, мм			
	канаміцин	тилозин	енрофлосацин	окситетрациклін	канаміцин	тилозин	енрофлосацин	окситетрациклін
№1	114,46	120,31	96,72	112,95	18,0	18,5	19,0	18,0
№2	106,44	104,76	99,21	115,88	18,0	19,0	19,0	18,5
№3	104,66	116,98	99,89	109,79	18,0	19,0	19,5	18,0
№4	111,37	129,22	107,35	110,73	18,0	19,0	19,0	18,5
№5	109,36	103,97	109,56	106,84	18,5	18,5	19,5	18,0
№6	108,41	102,42	112,60	108,14	18,0	19,0	19,0	18,0
№7	103,90	115,23	99,43	109,27	18,0	19,0	19,5	18,0
№8	107,88	101,16	107,9	105,89	18,0	19,0	19,0	18,0
№9	101,15	109,23	113,3	105,66	18,5	19,0	19,0	18,0
№10	109,21	103,03	108,85	108,6	18,0	19,0	19,0	18,0

Дані, наведені в таблиці 7 свідчать, що в усіх 10 пробах, у які було внесено канаміцин та досліджено мікробіологічним методом було виявлено його залишковий вміст, оскільки навколо всіх луночок із дисками, просоченими розчином антибіотика, виявлені чіткі зони інгібування, діаметр яких коливався від 18,0 мм до 18,5 мм, що повністю відповідало встановленими критеріям для оцінки цього методу. Також підтверджено наявність залишкового вмісту канаміцину у всіх пробах у концентрації від 101,15 мкг/кг до 114,46 мкг/кг методом РХ-МС/МС.

Щодо тилозину, то його залишковий вміст було виявлено мікробіологічною методикою у всіх досліджуваних пробах м'яса птиці, оскільки тест-культура *Kocuria rhizophila* АТСС 9341 проявила зони затримки росту навколо дисків із розчином антибіотика, які коливались у межах від 18,5 мм до 19 мм. Наявність залишків цього антибіотика підтверджена й методом РХ-МС/МС на рівні  $110,63 \pm 2,3$  мкг/кг.

Залишковий вміст енрофлоксацину було також виявлено мікробіологічною методикою у всіх досліджуваних пробах м'яса птиці, оскільки діаметри зон затримки росту тест-культури *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473) коливались у межах від 19,0 мм до 19,5 мм. Залишковий вміст цього антибіотика підтвердився і РХ-МС/МС на рівні  $105,66 \pm 1,9$  мкг/кг.

Залишковий вміст окситетрацикліну був виявлений за допомогою *Bacillus cereus* ATCC 11778, діаметри інгібування зон затримки росту, які утворилися навколо луночок із пробами, насиченими антибіотиками коливались від 18,0 мм до 18,5 мм, що повністю відповідало встановленим параметрам для оцінки цього методу. За проведення досліджень підтверджуючим методом виявлений залишковий вміст канаміцину в усіх пробах від 105,66 мкг/кг до 115,88 мкг/кг.

Друга частина досліду була проведена у виробничих умовах та спрямована на підтвердження чутливості розробленої нами методики визначення залишкового вмісту антибіотиків групи тетрациклінів у яйцях, отриманих від курей, яким випоювали антибіотик доксициклін, методу РХ-МС/МС.

Випоювання птиці антибіотику впродовж першого тижня досліду спричиняло збільшення залишкового вмісту доксицикліну в яйцях (жовтку). Доксициклін було виявлено в усіх пробах яєць розробленою мікробіологічною методикою, оскільки навколо всіх луночок із дисками виявили чіткі зони інгібування, діаметр яких коливався від 18,0 мм до 23,0 мм, що повністю відповідало встановленим параметрам для оцінки цього методу. Це підтвердили й методом РХ-МС/МС, де в аналогічних пробах залишковий вміст доксицикліну був на рівні від 208,681 мкг/кг до 2025,783 мкг/кг.

Після припинення застосування антибіотику відбулося поступове зниження залишкового вмісту доксицикліну в яйцях (жовтку), отриманих від піддослідних курей. Найнижчий рівень залишків доксицикліну було виявлено РХ-МС/МС на 13 добу досліду (45,597 мкг/кг), результати нижче межі детектування методу (29,0 мкг/кг) отримали на 14 добу досліду, проте *Bacillus cereus* ATCC 11778 на 14 добу все ще давав чіткі зони інгібування росту, діаметром 15,0 мм, що свідчило про наявність у досліджуваних пробах яєць залишкового вмісту антибіотиків тетрациклінової групи.

Чутливість розроблених мікробіологічних методик відповідає вимогам, що висуваються до скринінгових методів, адже за допомогою них можна визначити залишковий вміст антибіотиків на рівні  $\frac{1}{2}$  встановлених законодавством МДР, що підтверджено референтним методом РХ-МС/МС.

## ВИСНОВКИ

У дисертації науково обґрунтовано й експериментально доведено доцільність практичного застосування розроблених нами мікробіологічних методик визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва, які базуються на використанні антибіотика-маркера групи та підібраної специфічної (чутливої) тест-культури мікроорганізму, зокрема для

визначення залишкового вмісту  $\beta$ -лактамів, макролідів, тетрациклінів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацину. Підібрано оптимальні параметри для проведення кожної із розроблених методик, доведена їхня чутливість, точність та специфічність.

1. Доведена найвища чутливість мікроорганізмів та їх придатність для використання в якості тест-культур для виявлення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва: *Bacillus cereus* ATCC 11778 – антибіотиків групи тетрациклінів; *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 – антибіотиків групи  $\beta$ -лактамів та макролідів; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – групи аміноглікозидів; *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473) – групи хінолонів та *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240 – групи бацитрацинів.

2. Визначено антибіотиковий маркер (позитивний контроль) до групи антибіотиків: для тетрациклінів – окситетрациклін 0,06 мкг/см<sup>3</sup>; для  $\beta$ -лактамів та макролідів – тилозин 0,05 мкг/см<sup>3</sup>; для аміноглікозидів – дигідро-стрептоміцин 0,05 мкг/см<sup>3</sup>; для хінолонів – флюмеквін 0,04 мкг/см<sup>3</sup>; для групи бацитрацинів – цинкбацитрацин 0,05 мкг/см<sup>3</sup>.

3. Експериментально підібрані оптимальні за хімічним складом та величиною рН поживні середовища для відібраних тест-культур мікроорганізмів: Iso-sensitest agar з рН – для *Bacillus cereus* ATCC 11778 (рН 6,0), *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (рН 8,0), *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240 (рН 7,0); поживне середовище Plate count agar – для тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (з рН 8,0) – *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473) (з рН 6,5).

4. Запропонована пробопідготовка та підібрані буферні розчини для найкращої дифузії антибіотиків із проб продуктів птахівництва в агар, зокрема: для визначення залишкового вмісту антибіотиків тетрациклінової групи,  $\beta$ -лактамів та макролідів – буферний розчин 0,1 М фосфатний із рН 6,0; для групи аміноглікозидів та бацитрацинів – 1,5 М фосфатний буферний розчин із рН 8,0; для групи хінолонів – буферний розчин Tris buffer з рН 8,5.

5. Підібрані науково обґрунтовані параметри проведення досліджень для кожної із розроблених мікробіологічних методик: для визначення залишкового вмісту антибіотиків тетрациклінової групи та хінолонів – режим культивування *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473) – 30°C, 16–20 год; для визначення залишкового вмісту антибіотиків групи  $\beta$ -лактамів, макролідів, аміноглікозидів, бацитрацинів для тест-культур *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – 37°C, 6 – 20 год.

6. Встановлена чутливість кожного із розроблених мікробіологічних методик визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва (у м'ясі, нирках, печінці, жирі птиці та яйцях), показники якої коливаються залежно від групи антибіотика та виду тест-культури.

7. Специфічність та точність розроблених мікробіологічних методик для визначення залишкового вмісту антибіотиків групи  $\beta$ -лактамів, макролідів, тетрациклінів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацинів складає 98 %.

8. Підтверджено 100 % узгодженість між результатами досліджень, отриманими за використання розроблених мікробіологічних методик визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва та референтним методом РХ-МС/МС.

9. Доведено, що розроблені мікробіологічні методики визначення залишкового вмісту антибіотиків групи тетрациклінів, макролідів, β-лактамів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацинів на рівні ½ встановлених нормативно-правовими актами МДР відповідають вимогам, які висуваються до скринінгових методів, можуть використовуватися для цілей державного контролю.

### **ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

Для практики державних, виробничих, акредитованих калібрувальних лабораторій запропоновано впровадити методики щодо визначення залишкового вмісту антибіотиків різних груп: тетрациклінів, β-лактамів та макролідів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацинів у продуктах птахівництва.

### **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

#### **Статті у наукових фахових виданнях України**

1. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.** Методи визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів в продуктах птахівництва. Ветеринарна біотехнологія. 2015. № 26. С. 33–41. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

2. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.** Нормативно-законодавчі вимоги щодо визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів у продукції птахівництва. Ветеринарна біотехнологія. 2015. № 27. С. 96–104. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

3. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Київська Г. В. Порівняльний аналіз мікробіологічних методів щодо визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів у продукції птахівництва. Ветеринарна біотехнологія. 2016. № 28. С. 28–41. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

4. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.** Визначення залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи в продукції птахівництва мікробіологічним методом. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2016. Вип. 2(89), Ч.1. С. 60–68. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

5. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Шалімова Л. О. Визначення залишкових кількостей макролідів та β-лактамів у продукції птахівництва мікробіологічним методом. Ветеринарна біотехнологія. 2016. № 29. С. 75–83.

*(Здобувач брала участь в проведені експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

6. **Азиркіна І. М.** Визначення залишкових кількостей аміноглікозидів у продукції птахівництва мікробіологічним методом. Ветеринарна біотехнологія. 2017. № 30. С. 14–22. *(Здобувач брала участь в проведені експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

7. **Азиркіна І. М.** Визначення залишкових кількостей хінолонів у продукції птахівництва мікробіологічним методом. Ветеринарна біотехнологія. 2017. № 31. С. 12–21. *(Здобувач брала участь в проведені експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

8. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Шалімова Л. О., Козицька Т. Г. Визначення залишкових кількостей бакюлоприму та триметоприму у м'ясі, печінці, нирках мікробіологічним методом. Ветеринарна біотехнологія. 2017. № 32(2). С. 77–85. *(Здобувач брала участь в проведені експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

9. **Азиркіна І. М.**, Козицька Т. Г., Гаркавенко Т. О., Шалімова Л. О. Визначення залишкових кількостей антибіотиків групи бацитрацинів у продукції птахівництва мікробіологічним методом. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2020. Т. 22. № 98. С. 79–83. *(Здобувач брала участь в проведені експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).*

#### **Статті у наукових виданнях інших держав**

10. **Азыркина И. М.** Определение остаточных количеств макролидов и β-лактамов в продукции птицеводства микробиологическим методом Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сборник научных трудов. Вып. 20. Ч. 2 Горки: БГСХА. 2017 С. 241–248. *(Здобувач брала участь в проведені експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).*

#### **Патенти на корисну модель**

11. Піщанський О. В., Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Коваленко В. Л. Патент на корисну модель № 132436 Україна. А61К 31/65. Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи в продукції птахівництва мікробіологічним методом. Заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. № u2018 09754; заявлено 01.10.2018; опубліковано 25.02.2019. Бюл. № 4. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

12. Піщанський О. В., Гаркавенко Т. О., Меженська Н. А., **Азиркіна І. М.** Патент на корисну модель № 132437 Україна. А61К 31/7036. Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи аміноглікозидів в продуктах забою

птиці мікробіологічним методом. Заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. № u2018 09756; заявлено 01.10.2018; опубліковано 25.02.2019. Бюл. № 4. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

13. Піщанський О. В., Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Коваленко В. Л. Патент на корисну модель № 132439 Україна. А61К 31/65. Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи в яйцях та яєчних продуктах мікробіологічним методом. Заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. № u2018 09758; заявлено 01.10.2018; опубліковано 25.02.2019. Бюл. № 4. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

14. Піщанський О. В., Гаркавенко Т. О., Меженський А. О., **Азиркіна І. М.** Патент на корисну модель № 132438 Україна. А61К 31/545, С07Н 17/08. Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи макролідів та  $\beta$ -лактамів у продуктах забою птиці мікробіологічним методом. Заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. № u2018 09757; заявлено 01.10.2018; опубліковано 25.02.2019. Бюл. № 4. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

15. Піщанський О. В., Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Меженський А.О. Патент на корисну модель № 132440 Україна. МПК., А61К 31/00, А61 К 31/65, А61К 31/545 Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи макролідів та  $\beta$ -лактамів у яйцях та яєчних продуктах мікробіологічним методом. Заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. № u2018 09759; заявлено 01.10.2018; опубліковано 25.02.2019. Бюл. № 4. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

16. Піщанський О. В., Гаркавенко Т. О., Меженська Н.А., **Азиркіна І. М.** Патент на корисну модель № 132442 Україна. МПК, А61К 31/7036. Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи аміноглікозидів у яйцях та яєчних продуктах мікробіологічним методом. Заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. № u2018 09762; заявлено 01.10.2018; опубліковано 25.02.2019. Бюл. № 4. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

17. Піщанський О. В., Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Київська Г.В. Патент на корисну модель № 132441 Україна. А61К 31/47. Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи хінолонів у продуктах забою птиці мікробіологічним методом. Заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної

експертизи. № u2018 09761; заявлено 01.10.2018; опубліковано 25.02.2019. Бюл. № 4. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

18. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Шалімова Л.О., Горбатюк О. І. Патент на корисну модель № 145803 Україна. С12R 1/01. С12Q 1/04, G01N 1/28. Спосіб визначення залишкових кількостей антибіотиків групи хінолонів у продуктах забою птиці мікробіологічним методом. Заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. № u2020 04008; заявлено 02.07.2020; опубліковано 06.01.2021. Бюл. № 1. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

### **Методичні рекомендації**

19. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Шалімова Л. О. Визначення мікробіологічним скринінг-методом залишкових кількостей антибіотиків групи аміноглікозидів у м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах. Затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпеки та захисту споживачів (№ 3 від 20.12.2018 р.). К.: ДНДІЛДВСЕ, 2019. 24 с. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні текстової частини).*

20. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Шалімова Л. О. Визначення мікробіологічним скринінг-методом залишкових кількостей антибіотиків групи β-лактамів та макролідів у м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах. Затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпеки та захисту споживачів (№ 3 від 20.12.2018 р.). К.: ДНДІЛДВСЕ, 2019. 24 с. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні текстової частини).*

21. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Шалімова Л. О. Визначення мікробіологічним скринінг-методом залишкових кількостей антибіотики тетрациклінової групи у м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах. Затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпеки та захисту споживачів (№ 3 від 20.12.2018 р.). К.: ДНДІЛДВСЕ, 2019. 22 с. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні текстової частини).*

22. Гаркавенко Т. О., **Азиркіна І. М.**, Шалімова Л. О. Визначення мікробіологічним скринінг-методом залишкових кількостей антибіотиків групи хінолонів у м'ясі птиці, яйцях та яєчних продуктах. Затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпеки та захисту споживачів (№ 3 від 20.12.2018 р.). К.: ДНДІЛДВСЕ, 2019. 24 с. *(Здобувач брала участь в проведенні*

*експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні текстової частини).*

23. Мягка К. С., Азиркіна І. М., Шалімова Л. О. Морфологічна характеристика та культивування тест-культур мікроорганізмів, що рекомендуються для випробувань на залишковий вміст антибіотиків та антимікробних речовин мікробіологічним методом. Затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності та захисту споживачів (№ 1 від 25.12.2014 р.). К.: ДНДІЛДВСЕ, 2015. 24 с. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні текстової частини).*

#### **Тези наукових доповідей**

24. Гаркавенко Т. О., Азиркіна І. М. Визначення залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи в яйцях та яєчних продуктах мікробіологічним методом Наук.-техн. бюл. Ін-ту вет. мед. «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин». 2016. С. 11–13. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні тез).*

25. Гаркавенко Т. О., Азиркіна І. М. Визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів в продукції птахівництва мікробіологічним методом. XV Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини, якості і безпеки продукції тваринництва». Збірник матеріалів. Київ: НУБіП України. 2016. С. 13–14. *(Здобувач брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та написанні тез).*

#### **АНОТАЦІЯ**

**Азиркіна І. М. Науково-практичне обґрунтування застосування мікробіологічної методики визначення залишків антибіотиків у продуктах птахівництва.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ. 2021.

У дисертації теоретично й експериментально обґрунтовано застосування мікробіологічної методики визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва.

Уперше в Україні розроблено скринінгові мікробіологічні методи визначення залишкового вмісту антибіотиків групи: тетрациклінів, β-лактамів, макролідів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацинів у продуктах птахівництва. Встановлена чутливість розроблених мікробіологічних методів для визначення залишкового вмісту антибіотиків 6 груп для м'яса птиці, жиру, печінки, нирок, яєць, яка відповідає ½ встановлених національним законодавством МДР, що



повністю задовольняє вимоги, які встановлюються до скринінгових методів. Специфічність та точність розроблених методів складала 98 %.

Підтверджено 100 % ефективність розроблених мікробіологічних методик визначення залишків антибіотиків групи: тетрациклінів,  $\beta$ -лактамів, макролідів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацинів через порівняння з референтним методом РХ-МС/МС.

Практична цінність роботи полягає у впровадженні в лабораторну практику методичних рекомендацій щодо визначення залишкового вмісту антибіотиків у продуктах птахівництва, що дасть можливість збільшити перелік антибіотиків, залишковий уміст яких може бути визначений, розширити мережу лабораторій, здатних проводити ці дослідження, скоротити час проведення досліджень дослідження та кількість розхідних матеріалів, які використовуються в роботі.

**Ключові слова:** залишковий вміст антибіотиків, групи тетрациклінів,  $\beta$ -лактамів та макролідів, аміноглікозидів, хінолонів, бацитрацинів, продукти птахівництва, тест-культура *Micrococcus luteus (flavus) ATCC 10240*, тест-культура *Bacillus cereus ATCC 11778*, тест-культура *Kocuria rhizophila ATCC 9341*, тест-культура *Bacillus subtilis ATCC 6633*, тест-культура *Yersinia ruckeri NCIM 13282 (ATCC 29473)*.

## АННОТАЦІЯ

**Азиркина И. М. Научно-практическое обоснование применения микробиологической методики определения остатков антибиотиков в продуктах птицеводства.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.09 «Ветеринарно-санитарная экспертиза». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2021.

Диссертация посвящена теоретическому и экспериментальному обоснованию целесообразности использования микробиологических скрининг-методик для определения остаточного содержания 6 групп антибиотиков в продуктах птицеводства, доказанная эффективность и место применения в системе государственного контроля.

Впервые в Украине разработаны скрининговые микробиологические методики исследования остаточного содержания антибиотиков группы тетрациклинов, макролидов,  $\beta$ -лактамов, аминоглицозидов, хинолонов, бацитрацинов в продуктах птицеводства. Подобраны тест-культуры микроорганизмов для определения групп антибиотиков: *Bacillus cereus ATCC 11778* – антибиотиков тетрациклиновой группы, *Kocuria rhizophila ATCC 9341* – антибиотиков группы  $\beta$ -лактамов и макролидов; *Bacillus subtilis ATCC 6633* – группы аминогликозидов; *Yersinia ruckeri NCIM 13282 (ATCC 29473)* – группы хинолонов и *Micrococcus luteus (flavus) ATCC 10240* – к группе бацитрацинов. Установлен антибиотик – «маркер» группы: для тетрациклинов – окситетрациклин 0,06 мкг/см<sup>3</sup>; для  $\beta$ -лактамов и макролидов – тилозин 0,05

мкг/см<sup>3</sup>; для аминогликозидов – дигидрострептомицин 0,05 мкг/см<sup>3</sup>; для группы хинолонов – флюмеквин 0,04 мкг/см<sup>3</sup>; для группы бацитрацинов – цинкбацитрацин 0,05 мкг/см<sup>3</sup>.

Подобранные оптимальные питательные среды для тест-культур микроорганизмов: Iso-sensitest agar pH – для *Bacillus cereus* ATCC 11778 (pH 6,0), *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (pH 8,0), *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240 (pH 7,0) питательную среду Plate count agar – для тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (pH 8,0) – *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473) (pH 6,5).

Подобраны буферные растворы и отработана пробоподготовка для проведения исследований продуктов птицеводства микробиологическими методиками по определению остаточного содержания антибиотиков: тетрациклиновой группы – буферный раствор 0,1 М фосфатный pH 6,0; для определения остатков антибиотиков группы β-лактамов и макролидов – буферный раствор 0,1 М фосфатный pH 6,0; для группы аминогликозидов – 1,5 М фосфатный буферный раствор pH 8,0; для группы хинолонов – буферный раствор Tris buffer pH 8,5; для группы бацитрацинов – 1,5 М фосфатный буферный раствор pH 8,0. Предложенная нами пробоподготовка позволила улучшить экстракцию остаточного содержания антибиотика из пробы в буферный раствор, а также сократить затраты времени для исследования, количество использованного для приготовления пробы буферного раствора, исключила использование специального лабораторного оборудования: термостата, водяной бани, центрифуги. Определены параметры режима культивирования.

Установлена чувствительность разработанных микробиологических методик: антибиотиков тетрациклиновой группы в мясе птицы, почек – 50 мкг/кг; для яиц – 100 мкг/кг; для жира и печени – 150 мкг/кг; антибиотиков группы макролидов и β-лактамов: для мяса птицы, жира, почек, печени – 25 мкг/кг; и 50 мкг/кг для яиц; антибиотиков группы аминогликозидов чувствительность методик для мяса птицы, жира, кожи – 50 мкг/кг; для почек – 500 мкг/кг; для печени – 300 мкг/кг; группы аминогликозидов в яйцах чувствительность методик определена на уровне 250 мкг/кг; группы хинолонов чувствительность мяса птицы, почек, печени 50 мкг/кг; антибиотиков группы бацитрацинов чувствительность методик для мяса, печени, почек – 10 мкг/кг.

Специфичность и точность разработанных методов составляла 98 %.

Подтверждено 100 % эффективность разработанных микробиологических методик определения остатков антибиотиков группы: тетрациклинов, β-лактамов, макролидов, аминогликозидов, хинолонов, бацитрацинов путем сравнения с референтным методом РХ-МС / МС.

Практическая ценность работы заключается во внедрении в лабораторную практику методических рекомендаций по определению остаточного содержания антибиотиков в продуктах птицеводства, что позволит расширить перечень антибиотиков, остаточное содержание которых может быть определено, расширить сеть лабораторий, способных проводить эти

исследования, сократить время проведения исследований и количество расходных материалов, используемых в работе.

**Ключевые слова:** остаточное содержание антибиотиков, группы тетрациклинов,  $\beta$ -лактамов и макролидов, аминогликозидов, хинолонов, бацитрацином, продукты птицеводства, тест-культура *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240, тест-культура *Bacillus cereus* ATCC 11778, тест-культура *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, тест-культура *Bacillus subtilis* ATCC 6633, тест-культура *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473).

## SUMMARY

**Azirkina I.M. Scientific and practical substantiation of the application of microbiological methods for determining antibiotic residues in poultry products.** – The Manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of veterinary sciences on a specialty 16.00.09. «Veterinary and sanitary examination». National university of bioresources and nature management of Ukraine.Kiev.2021.

The dissertation theoretically and experimentally substantiates the use of microbiological methods for determining the residual content of antibiotics in poultry products.

For the first time in Ukraine, screening microbiological methods for determining the residual content of antibiotics of the group: tetracyclines,  $\beta$ -lactams, macrolides, aminoglycosides, quinolones, bacitracins in poultry products have been developed. The sensitivity of the developed microbiological methods for determining the residual content of antibiotics of 6 groups for poultry meat, fat, liver, kidneys, eggs, which meets  $\frac{1}{2}$  established by national legislation MDR, which fully satisfies the requirements for screening methods. The specificity and accuracy of the developed methods was 98%.

The 100% efficiency of the developed microbiological methods for determination of residues of antibiotics of the group: tetracyclines,  $\beta$ -lactams, macrolides, aminoglycosides, quinolones, bacitracins was confirmed by comparison with the reference method LC-MS / MS.

The practical value of the work lies in the introduction into laboratory practice of guidelines for determining the residual content of antibiotics in poultry products, which allowed to expand the list of antibiotics, the residual content of which can be determined, expand the network of laboratories capable of conducting these studies. consumables used in the work.

**Key words:** residual content of antibiotics, groups of tetracyclines,  $\beta$ -lactams and macrolides, aminoglycosides, quinolones, bacitracins, poultry products, test-culture *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240, test-culture *Bacillus cereus* ATCC 11778, test-culture *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, test-culture *Bacillus subtilis* ATCC 6633, test-culture *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 (ATCC 29473).

Підписано до друку 12.04.2021 року.      Формат 60x84\16  
Ум. друк. арк. 0,9                                      Обл.-вид.арк. 0,9  
Наклад 100 прим.                                      Зам. № 210237

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України  
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55, e-mail: nubip\_druk@ukr.net  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011







