

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ
ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
З ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ АНТИМІКРОБНИХ
ПРЕПАРАТІВ В МОЛОЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТОВИХ
НАБОРІВ ДЛЯ ЕКСПРЕС АНАЛІЗУ

(виробник «Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd.», Кунтай)



Київ 2018

УДК 637.11:614.3:615.33(072)

Методичні рекомендації розглянуті і схвалені Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол №1 від 22.02.2018р.).

Розробники: Мягка К.С., Костюк М.В.

Рецензенти:

Київська Г.В. – вчений секретар, завідувач НДВ організації і координації НДР, канд. вет. наук

Напненко О.О. – завідувач Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ, канд. вет. наук.

Методичні рекомендації з визначення залишків антимікробних препаратів в молоці за допомогою тестових наборів для експрес аналізу (виробник «Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd.», Китай) / [Мягка К.С., Костюк М.В.]. – К., ДНДІЛДВСЕ, 2018– 19 с.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів регіональних державних лабораторій ветеринарної медицини, молокопереробних підприємств та фермерських господарств, визначають порядок проведення досліджень щодо визначення залишкової кількості антибіотиків групи бета-лактамів, тетрациклінів, стрептоміцину та хлорамфеніколу в зразках сирого, пастеризованого та сухого молока за допомогою тестових наборів «2IN1(RU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці», «2IN1(EU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці», «4IN1(RU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів, стрептоміцину, хлорамфеніколу та тетрацикліну в молоці» та «Експрес - тест для визначення хлорамфеніколу в молоці» в лабораторіях ветеринарної медицини.



Зміст

Вступ	4
1 Галузь застосування	5
2 Стислий опис методики	5
3 Нормативні посилання	8
4 Принцип методу	9
5 Засоби вимірювання, допоміжні пристрої, реактиви та матеріали	10
6 Вимоги до кваліфікації персоналу	11
7 Умови виконання досліджень	11
8 Підготовка зразків	11
9 Правила використання тест-смужок для виявлення залишків антибіотиків	11
10 Підготовка до випробування	12
11 Порядок випробування	13
12 Оцінка результатів	14
13 Валідаційні данні	17
14 Охорона праці та техніка безпеки	17
15 Список літератури	18

Вступ

Проблема контролю безпечності та якості харчових продуктів і кормів завжди являла і являє один із напрямків роботи ветеринарної медицини країни. У продовольчій сировині та продуктах харчування тваринного походження, особливо промислового виробництва, можуть зустрічатись такі забруднювачі, як антибіотики, сульфаніламід, нітрофуран та гормональні препарати. Ці сполуки використовуються для підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин, профілактики захворювань або збереження кормів.

Широке використання антибіотиків як лікувальних і стимулюючих призвело до того, що продукти тваринного походження, в тому числі молоко, нерідко містять залишкові кількості цих препаратів.

Хлорамфенікол – антибіотик широкого спектру дії, що часто застосовується в тваринництві і має виражені антибактеріальні властивості. Але потрапляння його до організму людини призводить до появи побічних ефектів: гематотоксичних, апластичної анемії, для якої співвідношення доза/ефект ще не встановлені. Це призвело до заборони використання хлорамфеніколу для лікування продуктивних тварин в багатьох країнах, зокрема в країнах ЄС, США, Японії та Китаї.

У ветеринарній практиці тетрациклін, хлортетрациклін та окситетрациклін дозволені для використання, але перевищення залишкових рівнів тетрациклінів в продукції тваринного походження може становити ризик для здоров'я споживачів. Наявність тетрацикліну у продуктах харчування, що виготовляються з різних видів тварин, обмежується законами ЄС та України.

Антибіотики групи бета-лактамів – це найбільша група антимікробних препаратів, до якої входять близько 50 найменувань, що об'єднані наявністю в їх хімічній структурі бета-лактамного кільця яке відповідає за протимікробну активність цих сполук. З урахуванням високої клінічної ефективності та низької токсичності β-лактамі антибіотики складають

основу протимікробної хіміотерапії на сучасному етапі, займаючи важливе місце при лікуванні більшої частини інфекцій. Також бета-лактами використовуються як харчова добавка та як стимулятори росту тваринам, яких вирощують для харчової промисловості. Надмірне використання препаратів даної групи призвело до поширення стійких до антибіотиків форм мікроорганізмів, які являють серйозну небезпеку для здоров'я людини і тварин.

На даний час в Україні проводиться велика робота по гармонізації існуючих методик до міжнародновизнаних – це дозволяє впроваджувати нові методи та технології в лабораторну практику та тим самим попереджувати або мінімізувати рівень ризику, пов'язаний зі споживанням небезпечних для здоров'я людей продуктів, зменшити обсяг надходження на споживчий ринок небезпечної продукції.

1. Галузь застосування

Методика призначена для визначення залишкової кількості антибіотиків групи бета-лактамів, тетрациклінів, стрептоміцину та хлорамфеніколу в зразках сирого, пастеризованого та сухого молока (корів, буйволів, кіз, овець та кобил) за допомогою тестових наборів «2IN1(RU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці», «2IN1(EU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці», «4IN1(RU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів, стрептоміцину, хлорамфеніколу та тетрацикліну в молоці» та «Експрес - тест для визначення хлорамфеніколу в молоці» в лабораторіях ветеринарної медицини.

2. Стислий опис методики

Підготовка зразків: прямий метод.

Витрати часу: дослідження 20 зразків – 15 хв.

Чутливість та селективність методу наведені в табл. 1–4

Таблиця 1

Чутливість «2IN1(RU) Експрес - тесту для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці»

Назва антибіотиків	Межа детектування, мкг/кг
Антибіотики групи бета-лактамів	
Пеніцилін G	1,5–2
Ампіцилін	2–3
Амоксицилін	2–3
Оксацилін	5–7
Клоксацилін	3–6
Діклоксацилін	3–6
Нафцилін	8–10
Цефаквіном	5–7
Цефаксетрил	20–25
Цефалоніум	3–5
Цефазолін	15–20
Цефтіофур	80–100
Цефоперазон	3–5
Цефепірим	5–8
Антибіотики групи тетрациклінів	
Хлортетрациклін	5–7
Доксициклін	2–5
Окситетрациклін	7–10
Тетрациклін	7–10

Таблиця 2

Чутливість «2IN1(EU) Експрес - тесту для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці»

Назва антибіотиків	Межа детектування, мкг/кг
Антибіотики групи бета-лактамів	
Пеніцилін G	1,5–2
Ампіцилін	3–4
Амоксицилін	3–4
Оксацилін	5–7
Клоксацилін	6–8
Діклоксацилін	10–20
Нафцилін	20–30
Цефепірим	15–18
Цефалоніум	6–8
Цефазолін	40–50

Цефоперазон	2–3
Цефаквіном	12–18
Цефтіофур	80–100
Цефаетрил	25–30
Антибіотики групи тетрациклінів	
Доксициклін	30–40
Хлортетрациклін	30–40
Окситетрациклін	30–40
Тетрациклін	30–40

Таблиця 3

Чутливість «Експрес - тесту для визначення бета-лактамів, стрептоміцину, хлорамфеніколу та тетрацикліну в молоці»

Назва антибіотиків	Межа детектування, мкг/кг
Антибіотики групи бета-лактамів	
Пеніцилін G	1,5–2
Ампіцилін	2–3
Амоксицилін	2–3
Оксацилін	5–7
Клоксацилін	3–6
Діклоксацилін	3–6
Нафцилін	8–10
Цефаквіном	5–7
Цефаетрил	20–25
Цефалоніум	3–5
Цефазолін	15–20
Цефтіофур	80–100
Цефоперазон	3–5
Цефалірін	5–8
Аміноглікозиди	
Стрептоміцин	80-100
Дигідрострептоміцин	50-60

Хлорамфенікол	
Хлорамфенікол	0,2-0,3
Тетрацикліни	
Хлортетрациклін	5–7
Доксициклін	2–5
Окситетрациклін	7–10
Тетрациклін	7–10

Таблиця 4

Чутливість «Експрес - тесту для визначення хлорамфеніколу в молоці»

Назва антибіотиків	Межа детектування, мкг/кг
Хлорамфенікол	0,08-0,1

3. Нормативні посилання

- ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования. (Пожежна безпека. Загальні вимоги).
- ДСТУ 7237:2011 Система стандартів безпеки праці. Електробезпека. Загальні вимоги та номенклатура видів захисту.
- ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны. (Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони).
- ДСТУ 4834:2007 Молоко та молочні продукти. Правила приймання, відбору та підготовки проб до контролю.
- ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры. (Посуд та обладнання лабораторне скляне. Типи, загальні параметри та розміри).
- ДСТУ 3696:2003 Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевірки (ISO 3696:1987, IDM)

7. ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия. (Посуд мірний лабораторний скляний. Циліндри, мензурки, колби, пробірки. Загальні технічні умови.)

8. ДСТУ 2708-2006 Метрологія. Повірка засобів вимірювальної техніки. Організація і порядок проведення. ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры. (Посуд та обладнання лабораторне скляне. Типи, загальні параметри та розміри.)

9. ГОСТ 29224-91 Термометры ртутные стеклянные лабораторные. Технические условия. (Термометри ртутні скляні лабораторні. Технічні умови.)

4. Принцип методу

В даних тест-наборах використовується імунохроматографічний метод аналізу. Принцип дії методу полягає в тому, що при зануренні тест-смужки в біологічну рідину, остання починає мігрувати вздовж смужки по принципу тонкошарової хроматографії. Разом з нею рухаються мічені специфічні антитіла, що знаходяться у лунці, які активно зв'язуються з аналітом, що досліджується. Як результат, через визначений проміжок часу реєструється забарвлення в контрольній та аналітичній зонах.

Особливістю методики, що використовується в даних наборах, є використання двох компонентів. Перший компонент складається з мікролунки, що вміщує визначену кількість рецепторів та антитіл, мічених частинками золота. Другий компонент – це тест-смужки, що складаються з набору мембран зі специфічними лініями зв'язування.

При додаванні зразку молока в мікролунки, рецептори та антитіла зв'язуються з відповідними аналітами протягом першої інкубації за температури 40°C. Після занурення тест-смужки в зразок молока, рідина починає мігрувати вгору по тест-смужці та проходить через лінії зв'язування. Якщо зразок не містить антибіотик, на тестовій смужці з'явиться кольорове забарвлення, що буде вказувати на відсутність аналізованих речовин, в зразку

молока. Та навпаки, наявність антибіотиків в зразку завадить появі кольорового фарбування тестових ліній.

Перевагою методу є його швидкість та легкість виконання, візуальна оцінка результату аналізу та можливість використання приладу для зчитування результатів.

5. Засоби вимірювання, допоміжні пристрої, реактиви та матеріали

5.1 Засоби вимірювання:

– піпетковий дозатор з нерегульованим об'ємом дози 200 мкл (входить до набору);

5.2 Додаткові пристрої:

- інкубатор, здатний підтримувати температуру $40 \pm 2^\circ\text{C}$;
- таймер;
- рідер (необов'язково).

5.3 Реактиви та матеріали:

– тест-набори:

- «2IN1(RU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці »;
- «2IN1(EU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці»
- «4IN1(RU)Експрес - тест для визначення бета-лактамів, стрептоміцину, хлорамфеніколу та тетрацикліну в молоці»;
- «Експрес - тест для визначення хлорамфеніколу в молоці».

Склад наборів:

– тест-смужки та лунки для виявлення залишків антибіотиків 96 штук у 12 контейнерах (по 8 смужок та лунок в контейнері);

- негативний зразок (в мікролунках);
- позитивний контроль (в мікролунках);
- піпетковий дозатор з нерегульованим об'ємом дози 200 мкл;
- накінцівники до піпеткового дозатора – 100 штук.

6. Вимоги до кваліфікації персоналу

До виконання досліджень та обробки результатів допускаються фахівці, що мають середню або вищу спеціальну освіту, досвід роботи в лабораторії та пройшли відповідне навчання.

7. Умови виконання досліджень

При виконанні досліджень мають бути дотримані наступні умови, табл. 5:

Таблиця 5

Умови виконання досліджень

Температура повітря, °С	20 ± 10
Атмосферний тиск, кПа	84,0–106,7
Напруга в мережі, В	220 ± 10
Частота перемінного струму, Гц	50 ± 1

8. Підготовка зразків

Відбір зразків сирого товарного молока проводять згідно ДСТУ 4834 [4]. Молоко для проведення тестувань має зберігатись в холодильнику за температури 0–15 °С. За необхідності довготривалого зберігання зразків, їх можна зберігати за температури –15 °С або нижче терміном до 2-х місяців. Заморожені зразки перед дослідженням повільно розморожують (в холодильнику протягом ночі або шляхом занурення тари в холодну воду) та добре перемішують.

Помітне осідання білку вказує на непридатність зразку. Розморожені зразки повторно не заморожують.

9. Правила використання тест-смужок для визначення залишків антибіотиків

9.1. Тест-смужки необхідно зберігати у щільно зачинених контейнерах, які є в комплекті, за температури 2–8 °С (не допускати заморожування набору).

9.2. Закривати контейнер кожного разу після того, як була взята необхідна кількість смужок та лунок.

9.3. За високої вологості кришку контейнеру потрібно відкривати тільки після повного його прогрівання до кімнатної температури.

9.4. Тестову смужку використовувати лише один раз.

9.5. Не торкатися мембрани на тестовій смужці, місця, де відображаються лінії (рис.1).

10. Підготовка до випробування

10.1. Підготовка тест набору:

– контейнер з тестовими смужками та лунками довести до кімнатної температури (15-30°C);

– взяти з контейнера необхідну кількість тестових смужок та лунок, відповідно до кількості зразків;

– зробити в верхній зоні тестової смужки, (рис.1), відмітку для ідентифікування зразка.

10.2. Підготовка зразків сирого та пастеризованого молока:

– ретельно перемішати перед дослідженням;

- зразок повинен бути рідким, без згустків та осаду.

10.3 Підготовка зразків сухого молока:

– розвести зразок в співвідношенні 1:9 (10 г сухого молока розвести в 90 мл дистильованої води), добре перемішати.

10.4 Підготовка негативного зразку (входить в набір):

- додати 200 мкл дистильованої води в мікролунку з негативним зразком та добре перемішати до однорідності.

10.5 Підготовка позитивного стандарту (входить в набір):

- додати 200 мкл негативного молока в мікролунку з позитивним стандартом та добре перемішати до однорідності.

10.6 Підготовка інкубатора:

– включити інкубатор в мережу та дочекатись стабілізації температури до 40±2°C.

11. Порядок випробування

11.1 Встановити лунки в інкубаторі, підготовленому згідно п.10.6.

11.2 За допомогою піпеткового дозатору відібрати 200 мкл зразку молока та наповнити лунку.

11.3 Перемішати зразок за реагентом, що знаходиться в лунці, шляхом п'ятиразового набору та зливання його в лунку, щоб забезпечити повне змішування молока з реагентом.

11.4 Зразу після перемішування натиснути клавішу «START/STOP» на інкубаторі, після чого почнеться зворотній відлік часу 1-ї інкубації.

11.5 Вставити у відповідні лунки з сумішшю молока та реагенту тестові смужки стороною на яку вказують намальовані зі зворотного боку стрілки (рис.1).

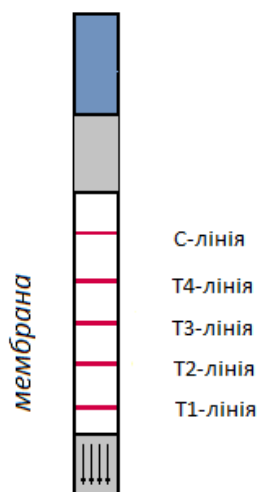
11.6 Залишити тестові смужки в такому положенні. Для початку другої інкубації натиснути клавішу «START/STOP» на інкубаторі, після чого почнеться зворотній відлік часу 2-ї інкубації.

Тестовий набір	Chloramphenicol	2in1(EU)/(RU)	4in1(RU)
Час першої інкубації	8 хвилин	3 хвилини	5 хвилин
Час другої інкубації	6 хвилин	5 хвилин	7 хвилин

11.7 Після закінчення другої інкубації, тобто після появи звукового сигналу, натиснути на приладі клавішу «START/STOP» для його призупинення.

11.8 Візуально або за допомогою рідеру оцінити результат аналізу.

Рис.1 Тест-смужка



12. Оцінка результатів

Отримані результати оцінюють візуально за наявністю чи відсутністю ліній, що з'явилися та за інтенсивністю їх кольору.

Увага! Ширина чи товщина ліній не має значення. Результат необхідно оцінювати тільки по інтенсивності (насиченості) кольору.

12.1. Контрольна лінія використовується, як індикатор, який завжди забарвлюється незалежно від тестових ліній. Якщо контрольна лінія не забарвлюється, це свідчить про те, що **результат дослідження є недійсний**.

12.2. Оцінювання отриманих результатів проводять по кожній тестовій лінії окремо.

Тест є негативним (антибіотик в зразку відсутній або наявний у концентрації нижчій за чутливість тестового набору), якщо:

- Лінія відповідного антибіотику (Рис.2) темніша ніж контрольна лінія.

Тест є позитивний (антибіотик в зразку наявний в кількості вищій за межу виявлення набору), якщо:

- Лінія відповідного антибіотику світліша за контрольну або така сама за інтенсивністю кольору, як контрольна лінія;

- Лінія відповідного антибіотику відсутня.

Якщо лінія антибіотику така сама за інтенсивністю кольору, як контрольна лінія, результат є **умовно-позитивний**.

12.3. Після інтерпретації однієї тестової лінії, аналогічно оцініть наступні тестові лінії.

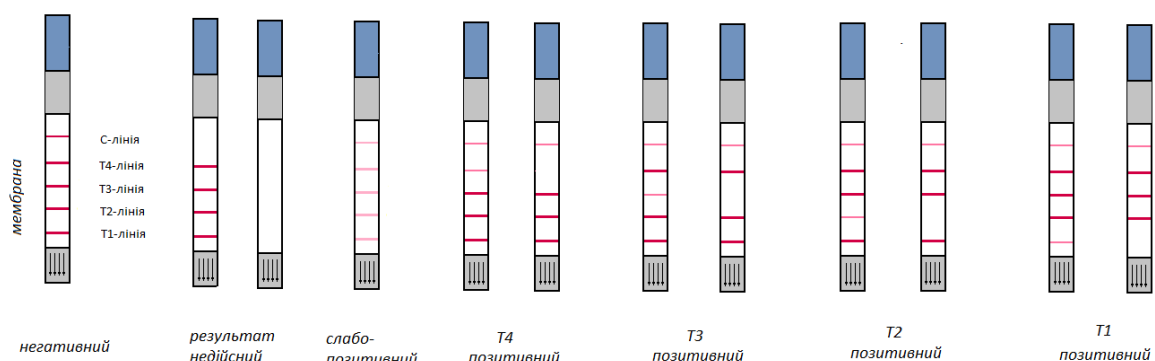
12.4. Якщо виникають сумніви при інтерпретації отриманого результату, тестування повторюють.

12.5. При використанні рідера для інтерпретації результатів: зразок вважається негативним при $R > 1.1$, слабо-позитивний $0.9 \leq R \leq 1.1$, позитивний $R < 0.9$

12.6. Оцінка результатів, отриманих за допомогою «Експрес - тесту для визначення бета-лактамів, стрептоміцину, хлорамфеніколу та тетрацикліну в молоці».

12.6.1. На тестову смужку нанесені лінії: контрольна – «С», лінія бета-лактамів – «Т1», лінія стрептоміцину – «Т2», лінія хлорамфеніколу – «Т3» лінія тетрациклінів – «Т4», (рис.2).

Рис.2 «4IN1 (RU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів, стрептоміцину, хлорамфеніколу та тетрацикліну в молоці». Оцінка результатів.

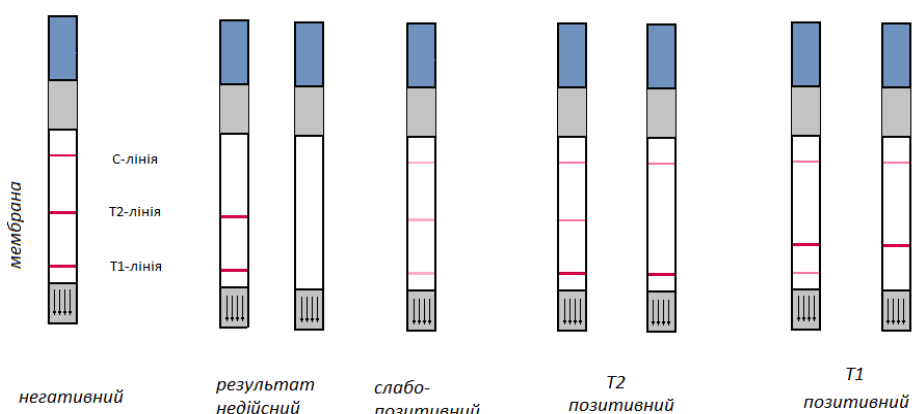


12.7. Оцінка результатів, отриманих за допомогою «2IN1 (RU) Експрес - тесту для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці » та

«2IN1 (EU) Експрес - тесту для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці ».

12.7.1. На тестову смужку нанесені лінії: контрольна – «С», лінія тетрациклінів – «Т1», лінія бета-лактамів – «Т2» (рис.3).

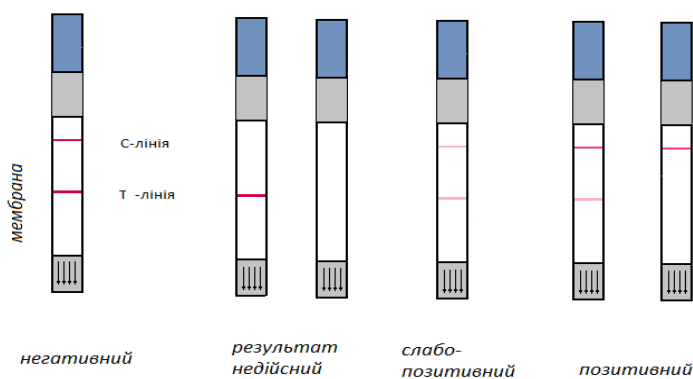
Рис.3 «2IN1 (RU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці » та «2IN1 (EU) Експрес - тест для визначення бета-лактамів та тетрациклінів в молоці ». Оцінка результатів.



12.8. Оцінка результатів, отриманих за допомогою «Експрес - тест для визначення хлорамфеніколу в молоці».

12.8.1. На тестову смужку нанесені лінії: контрольна – «С», лінія хлорамфеніколу – «Т» (рис.4).

Рис.4 «Експрес - тест для визначення хлорамфеніколу в молоці». Оцінка результатів.



12.9 Паралельно зі зразками , що досліджуються, бажано досліджувати зразки позитивного та негативного контролю (пп.10.4-10.5), це полегшить проведення інтерпретації результатів.

12.10 Позитивні зразки потребують подальшого підтвердження арбітражним методом.

13.Валідаційні данні

Для отримання валідаційних даних були досліджені негативні зразки та зразки з додаванням стандартів антибіотиків на рівнях зазначених виробником до кожного набору та зразків з внесенням добавки стандарту антибіотиків, що не відносяться до визначаємих груп антибактеріальних препаратів. Було встановлено, що чутливість тест-наборів відповідає заявленій. Відсутня перехресна чутливість з антибіотиками інших груп, в концентраціях вище рівнів встановленої для них максимально допустимої межі.

14.Охорона праці та техніка безпеки

За проведення досліджень потрібно дотримуватись вимог пожежної безпеки за вимогами ГОСТ 12.1.004 [1] та електробезпечності при роботі з електроустаткуванням – ДСТУ 7237 [2].

Повітря робочої зони має відповідати вимогам ГОСТ 12.1.005 [3].

15. Список літератури

1. Методичні рекомендації щодо процедур здійснення відбору зразків на виконання Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження: Наказ Головного державного інспектора ветеринарної медицини України від 09 лютого 2017 року № 7.
2. План державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження на 2018 рік // Затверджений Наказ Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів від 5 грудня 2017 року № 1167.

МЯГКА Катерина Сергіївна
завідувач науково-дослідного відділу ветеринарно-санітарної експертизи
КОСТЮК Марія Валеріївна
головний фахівець - лікар ветеринарної медицини – ветсанексперт

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
З ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ АНТИМІКРОБНИХ
ПРЕПАРАТІВ В МОЛОЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТОВИХ
НАБОРІВ ДЛЯ ЕКСПРЕС АНАЛІЗУ
(ВИРОБНИК «Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd.», Китай

