

1260. HCH residues (α , β , γ - isomers) was found and from <0.001 to 0.0032 mg / kg of DDT (and its metabolites) from <0.001 to 0.0031 mg / kg was found that the difference between these parameters varies on the plants from which the bees collect nectar and honey flow period.

Key words: pesticide residues, honey, gas chromatography.

Дата надходження в редакцію: 09.01.2013 р.

Рецензент: к.вет.н., доцент О. І. Скляр

УДК 636.09:604.4:577.18:616-093.006.2

ПРИНЦИПИ РОБОТИ ТА ПОРІВНЯЛЬНА ДЕТЕКТОРНА ЕФЕКТИВНІСТЬ МЕТОДІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБІОТИКІВ В МОЛОЦІ

О. Б. Титор, аспірант, Сумський НАУ

Розглянуто принципи роботи, детекторна ефективність, умови для застосування на проведення визначення залишкових кількостей антибіотиків з допомогою тест системи Charm II, Charm ROSA-тесту, системи Parallax, біосенсору прототипу Immunomat та імунно-ферментного аналізу.

Постановка проблеми в загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. Разом із підвищенням вимог до якості та безпечності харчових продуктів відбуваються зміни в законодавчих актах, що регламентують контроль залишкових кількостей антибіотиків та відповідні рівні чутливості (Наказ Державного комітету ветеринарної медицини від 24.06.2011 р. 246 Про затвердження Заходів щодо запобігання надходження залишків хлорамфеніколу та інших ветеринарних препаратів в молочні продукти українського виробництва на 2011-2016 роки) та змінюються методи та тест-системи з допомогою яких здійснюється цей контроль. На другий план відходять мікробіологічні методи, що застосовуються у наступних тест-системах: Полютест, Копан-тест, Дельвотест та БРТ тест (чутливість яких знаходиться на рівні 10 мкг/кг для хлорамфеніколу), а на перший план виходять методи, чутливість яких дозволяє детектувати антибіотики на межі максимально допустимих рівнів (МДР) або максимально відносних допустимих рівнів (МВДР для хлорамфеніколу становить 0,3 мкг/кг). Для того, щоб обрати тест – систему, що задовольняла б усі параметри відбору, необхідно ознайомитися з принципами роботи та головними характеристиками тест-систем, що використовуються у інших країнах. [1,3,4]

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. Складність і комплексність проблем забезпечення якості, безпеки та конкурентоздатності продукції тваринного походження привертає увагу науковців. Помітний внесок у розв'язання цієї проблеми внесли О. Якубчак, В. Касянчук, Д. Янович, С. Змарлицькі, К. Семко, О. Салганська, В. Пятницький, С. Дем'яненко, В. Забігайло, С. Кваша, С. Зоря, І. Грабчук та інші. Проте багато питань потребують подальшого дослідження. Одним з таких питань є використання лише таких методів та тест-систем, чутливість яких дозволяє визначати залишкові кількості антибіотиків менше

їх максимально допустимих рівнів, що регламентуються нормативними документами ЄС. [2,4]

Формулювання цілей статті. Зробити порівняльний аналіз принципів детекції що застосовуються в різних методах досліджень на антибіотики та визначити ефективність різних тест – систем, що у ЄС та в Україні.

Виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням отриманих наукових результатів. Матеріалами слугували наукові літературні джерела, законодавча та нормативна база в галузі контролю вмісту залишкових кількостей антибіотиків у молоці, а також власні дослідження щодо роботи тест-систем. Нами були розглянуті та докладно проаналізовані принципи функціонування тест-системи Charm II, Charm ROSA-тест, системи Parallax, біосенсору прототипу "Immunomat", а також методу імунно-ферментного аналізу, які дозволяють мати широкий індикаційний спектр визначення антибіотиків, а також найнижчу межу їх детектування.

В Україні для визначення антибіотиків в молоці використовуються Charm II, Charm ROSA-тест та ІФА.

Шарм тест був розроблений Стенлі Е. Шармом, який в 1979 році запатентував принцип роботи даного тесту. З 1987 року фірмою Charm Sciences випускається модифікований формат даного тесту Шарм II. Він діє на основі радіоактивно мічених рецепторів зв'язування (антитіла зв'язуючий аналіз). Принцип тесту заснований на конкуренції між міченими радіоактивними атомами ^{14}C або ^3H антибіотиками чи сульфаніламидами та присутніми у молоці залишками антибіотиків, при зв'язуванні їх з рецепторами. Вимірюваною величиною є кількість зв'язаних радіоактивно мічених речовин, величина яких виражається з допомогою лічильника в якості імпульсів у хвилину ("count per minute" = CPM). При дослідженні молока вільного від залишкових кількостей антибіотиків з рецепторами зв'язуються тільки радіоактивно мічені атоми інгібіторів, тому на лічильнику фіксується найвища кількість імпульсів.

При дослідженні молока в якому є залишкові кількості антибіотиків, кількість вимірних імпульсів відповідно спадає. Для визначення кінцевого результату ("позитивний" або "не знайдено"), порівнюється кількість імпульсів за хвилину з попередніми калібрувальними вимірюваннями даного приладу.

Реакція зв'язування між рецепторами та функціональними групами відбувається тоді, коли всі речовини груп захоплені, що обумовлює високу чутливість, але низьку специфічність тест-систем. Через це, Шарм II в першу чергу "скринінг-тест", який може диференціювати окремі антибактеріальні класи, однак, не в змозі визначити, активний компонент якісно або кількісно. Щоб дозволити кількісне визначення, необхідна підготовки перед вимірами стандартних кривих за допомогою відомих концентрацій хімічних речовин. Таким чином, визначення кількості інгібітору може бути зроблена, якщо його ідентифіковано. Комерційно доступними є Шарм II для бета-лактамів, сульфаніламідів, тетрациклінового ряду антибіотиків, аміноглікозидів та макролідів.

Charm ROSA-тест заснований на технології ROSA (Rapid One Step Assay - швидкість за рахунок однієї робочої операції). Цей метод дозволяє визначати Максимально Лімітований Залишок антибіотиків у молоці (MRL - Maximum Residue Limit) на рівні безпеки країн ЄС, а також чинного законодавства США, Австралії та інших країн. Тест у продажу з 1998 року. Charm ROSA-тест можна застосовувати для аналізу коров'ячого, овечого та козячого молока сирого, пастеризованого або сухого (після відновлення). Charm ROSA MRL можна використовувати для аналізу зразків молока як в невеликому масштабі: на рівні ферм або молокоприймальних пунктів так і для проведення широкомасштабних тестувань на молокопереробних підприємствах та в лабораторіях контролю якості.

Суть методу визначення залишків антибіотиків групи бета-лактамі в молоці за допомогою тест-системи Charm ROSA-тест полягає у зміні кольору ліній на тестовій смужці, обробленої бактеріальним рецептором, який має здатність зв'язуватися з антибіотиками бета - лактамного ряду. Бактеріальна культура, яка є основою рецептора, при температурі 56 ± 1 °C розмножується з виділенням кислоти, що призводить до зміни pH. Відповідно, на тестовій смужці формуються лінії з різною інтенсивністю кольору, яка залежить від присутності чи відсутності в пробі молока інгібіторів бета – лактамної природи. [6]

В основі імунно-ферментного аналізу лежить взаємодія антигенів з антитілами. Планшет, що входить до складу набору сенсibilізований антитілами специфічними до антибіотиків. Аналіз виконується таким чином: стандартні розчини відповідного антибіотика та досліджувані проби дозуються в лунки планшета, до них додаються

розчини, що містять кон'югат хлорамфеніколу з ферментом. При інкубації планшета протягом визначеного часу молекули хлорамфеніколу, що містяться в пробах або в стандартних розчинах і молекули кон'югату хлорамфеніколу з ферментом, конкуруючи між собою, зв'язуються з антитілами до хлорамфеніколу на поверхні планшета (конкурентний імунферментний аналіз). На стадії промивання з лунок планшета видаляються вільні молекули кон'югату хлорамфеніколу з ферментом. В лунки дозується комбінований розчин субстрату (карбамід-пероксид водню) з хромогеном (тетраметилбензидин). У процесі інкубації, при хімічній взаємодії субстрату з хромогеном, у якому ферментний фрагмент молекули кон'югату, зв'язаний на поверхні лунки, виступає як каталізатор, утворюються забарвлені продукти реакції. Через визначений час розвитку кольорової реакції, у результаті якої безбарвний хромоген забарвлюється в блакитний колір, у лунки додається стоп-реагент, який змінює блакитний колір розчину на жовтий. Оптична щільність у лунках, що вимірюється на спектрофотометрі (рідері) за 450 нм, обернено пропорційна концентрації антибіотика в досліджуваних зразках..[5]

Система Parallax - це система швидкого тесту, заснована на так званій SPFA технології ("твердої фази флуоресцентного імуноаналізу"). Тест-система виявляє бета-лактамі антибіотики, (клоксацилін, цефалірін, пеніцилін G і цефтіофур), сульфаніламідів (сульфаметазин, сульфатіазол, сульфадиметоксин), антибіотики тетрациклінового ряду.

Parallax - це система, яка автоматично виконує всі кроки, а результат друкується на принтері вбудованому в систему. Проба молока вводиться у луночку, в якій знаходяться мічені флуоресцент - кон'югатом антитіла. Тут проходить перший етап інкубації, антитіла зв'язуються з антибактеріальними засобами, якщо ті присутні у молоці. Потім молоко втягується в капіляри тест картриджа, які покриті відповідними антибактеріальними засобами. Решта вільних антитіл можуть тепер зв'язатися з антибактеріальними засобами в капілярах під час двохвилинного інкубаційного періоду. Автоматично після промивки, картридж вставляється в читувач, в якому зв'язані флуоресцент - кон'югатом антитіла під дією лазерного променя флуоресціюють. Визначається інтенсивність флуоресценції і використовується для розрахунку результатів. Чим вищим є ступінь флуоресценції, тим менше антимікробних речовин містилося у пробі. [6]

Біосенсор прототипу ("Immunomat") являє собою комбінацію біологічних компонентів - таких як антитіла, лектини, ДНК або клітини - і фізичних компонентів. Принцип роботи біосенсор - прототипу «Імуномат» - перетворення біохімічних або біофізичних процесів (наприклад, зв'язування антиген-антитіла) в електричний сигнал, який під-

силюється і передається для оцінки в електронний блок виміру. Це модифікований "PASA системи" (паралельний масив датчиків близькості), імуно-хімічний біосенсор, з можливістю паралельного виявлення різних антибактеріальних засобів

Принцип тесту заснований на непрямій конкуренції за зв'язування між антигеном та антитілами (антибактеріальними субстанціями молока і міченими антитілами системи). Вимірюваний сиг-

нал генерується за допомогою додавання хемілюмінесцентного субстрату, при цьому в результаті, каталізованої пероксидазою, екзотермічної реакції пероксиду водню з люміналом генерується світло. Випромінювання обернено пропорційне концентрації антибіотику в молоці. В даний час за допомогою Immunomat можна досліджувати молоко на залишки бета-лактамів, сульфаніламідів, аміноглікозидів та макролідів. [6]

Таблиця 1.Порівняння технічних характеристик розглянутих тест-систем та ІФА

Характеристика	Charm II	Charm ROSA-тест	Parallux	Immunomat	ІФА
Межа детектування	Нижча регламентованих МДР для ЄС	Нижча регламентованих МДР для ЄС	Нижча регламентованих МДР для ЄС	Нижча регламентованих МДР для ЄС	Нижча регламентованих МДР для ЄС
Технічне забезпечення (необхідні прилади)	Нагрівачий блок, центрифуга, вортекс, вимірюючий пристрій, принтер	Інкубатор, зчитуючий та інтерпретуючий результати прилад	Сканер штрих-кодів, зчитуючий та інтерпретуючий результати прилад	Зчитуючий та інтерпретуючий результати прилад	Рідер, вошер, центрифуга, комп'ютер зі спеціальним програмним забезпеченням, принтер
Калібрування	Щоденно	Щоденно	Щоденно	Перед серією вимірювань	Дозатори калібруються щотижнево
Необхідні стандарти	позитив та негатив стандарти	позитив стандарт	позитив та негатив стандарти	Не потрібні	позитив та негатив стандарти
Зберігання стандартів у сухому вигляді	0-4,4 °C	0-7 °C	0-29 °C	-	0-4 °C
Зберігання стандартів у відновленому вигляді	0-4,4 °C -3 доби - 15° C-2 місяці	0-7 °C -2 доби - 15° C - 2 місяці	0-7° C -8 діб	-	-15°C-1 місяць
Кількість проби	5 мл	300 мкл	400 мкл	1 мл	50 мкл
Температура проби	0-7°C	0-7°C	0-29°C	Кімнатна температура	15°C
Тривалість досліджу	15-20 хв.	8 хв.	4 хв.	3 хв.	2,5-3 год.

Висновки:

1.Отже, кожна з цих тест-систем та імуноферментний аналіз за своєю межею детектування дозволяють знаходити залишкові кількості антибіотиків на межі та вище регламентованого законодавством України та ЄС максимального відносного допустимого рівня.

2.Принцип роботи Шарм тесту- конкуренція між міченими радіоактивними атомами та антибіотиками,що можуть бути наявними у молоці.

3. В основі імуно-ферментного аналізу лежить взаємодія антигенів з антитілами. Планшет, що входить до складу набору сенсифікований антитілами специфічними до антибіотиків.

4. Принцип роботи Роза Шарм тесту – наявність на тест-смужці бактеріального рецептору,

що має здатність зв'язуватись з антибіотиками.

5.В основі системи Паралюкс аналізу лежить взаємодія антигенів з антитілами.

6.Принцип роботи біосенсору -прототипу «Імуномат» - перетворення біохімічних або біофізичних процесів в електричний сигнал, який підсилюється і передається для оцінки в електронний блок виміру.

7. Найнижчу вартість, виходячи з вартості технічного забезпечення та самої тест-системи, має Charm ROSA-тест.

8.ІФА-єдиний з перерахованих метод, для якого можна розробити повну процедуру валідації, але цей метод є найбільш ємним по часу затраченому на дослідження, тому не скрізь може застосовуватися.

Список використаної літератури :

1. Артиш В.І. Сучасний стан виробництва екологічно чистої продукції в країнах світу / Артиш В.І. //Економіка АПК.- 2005. - №3. - С. 50-53.

2. Касянчук В.В. Проблеми безпечності української молочної продукції з огляду на вимоги міжнародних стандартів/В.В.Касянчук//Продукты & ингредиенты. - 2008.- № 5 - С.54-56.

3. Наказ Державного комітету ветеринарної медицини від 24.06.2011 р. № 246 Про затвердження Заходів щодо запобігання надходження залишків хлорамфеніколу та інших ветеринарних препаратів в молочні продукти українського виробництва на 2011-2016 роки.

4. Янович Д.В. Вимоги до методів аналізу молока за показниками безпеки при експорті до країн ЄС/Д.В. Янович // Стандарти .-2009- №2-С.40-42.

5. Янович Д.В.Методичні вказівки по кількісному визначенню хлорамфеніколу в зразках м'яса молока, яєць та меду тест системою рідаскрін хлорамфенікол/ Косенко Ю.М., Костюк А.О.,Засадна З.С.

6. Quandt B. Identifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch mittels Schnelltestsystemen:дисертація доктора ветеринарних наук Brigitte Quandt.- Munchen 2006.-17s.

Рассмотрены принципы работы и основные характеристики тест-систем Charm II, Charm ROSA-тест, Parallax, Immunomat и ИФА. Каждая из перечисленных тест-систем и иммуноферментный анализ пригодны для использования, согласно Приказу Государственного комитета ветеринарной медицины от 24.06.2011 г. № 246 Об утверждении Мероприятий по предотвращению поступления остатков хлорамфеникола и других ветеринарных препаратов в молочные продукты украинского производства на 2011 - 2016 годы, по показателю предел детектирования и позволяют находить остаточные количества антибиотиков в концентрации 0,3 мкг / кг (поскольку для хлорамфеникола минимальное относительное разрешенный уровень МВДР составляет 0,3 мкг / кг) и, соответственно, другие тест-системы, чувствительность которых находится на уровне 10 мкг / кг (Дельвотест, БРТ-тест и др.) не должны использоваться.

Низкую стоимость, исходя из стоимости технического обеспечения и самой тест-системы, имеет Charm ROSA-тест, а ИФА - единственный из перечисленных метод, для которого можно разработать полную процедуру валидации, но этот метод является наиболее емким по времени необходимому на исследование, поэтому ИФА не везде может применяться.

Principles of ELISA and other methods for antibiotic residue detection were reviewed. Different tests: Charm II, Charm ROSA-test, Parallax, Immunomat were tested. According to Decree of State Committee of Veterinary medicine of Ukraine from 24.06.2011 № 246 On approval of events to prevent the chloramphenicol flow and other residues of veterinary drugs in dairy products of Ukrainian origin for 2011-2016. All evaluated tests had required sensitivity and may be used in routine practice. Tests were characterized and the ability to detect antibiotic in concentration of 0,3 ppb (minimal chloramphenicol concentration according) was confirmed. Test-systems, which permit to detect antibiotic at minimal concentration 10 ppb (Delvotest, BRT test and other) are not recommended for use.

Based on the cost and technical maintenance of the test system Charm ROSA-test has the lowest cost. Among described methods only ELISA can be validated, but this method is long-termed in performance and has other limitations for routine laboratory practice scale.

Дата надходження в редакцію: 03.01.2013 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Т. І. Фотіна