

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ
ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК**

**ВИЯВЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ІНШИХ
ІНГІБІТОРІВ У СИРОМУ МОЛОЦІ.**

**ВИКОРИСТАННЯ СКРИНІНГОВИХ ТА ПІДТВЕРДЖУЮЧИХ МЕТОДІВ
У МЕЖАХ ПРОГРАМИ КОНТРОЛЮ СИРОГО МОЛОКА**

(Методичні рекомендації)

Київ-2024

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок (протокол №3 від 10 липня 2024 р.)

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів (протокол №6 від 23 вересня 2024 р.).

Розробники: Камінська О.В., Гаркавенко Т.О., Стибель В.В., Янович Д.В.

Рецензенти: Музика В.П., Бовкун А.О.

Виявлення залишків протимікробних препаратів та інших інгібіторів у сирому молоці. Використання скринінгових та підтверджуючих методів у межах програми контролю сирого молока: Методичні рекомендації / О. В. Камінська, Т. О. Гаркавенко, В. В. Стибель, Д. В. Янович – Львів: ДНДКІВПКД, 2024. – 51 с.

У методичних рекомендаціях викладено скринінгові і підтверджуючі методи для контролю протимікробних препаратів та інших інгібіторів у сирому молоці.

Рекомендації призначені для фахівців регіональних, районних та міжрайонних державних лабораторій Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів, інших уповноважених Державною службою України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів на проведення досліджень зразків сирого молока в межах програми контролю сирого молока лабораторій, операторів ринку молока та молочних продуктів, фахівців Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів, що здійснюють контроль виробництва молока та його введення в обіг, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та здобувачів вищої освіти зі спеціальностей 211 «Ветеринарна медицина» і 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза».

ЗМІСТ

	Вступ.....	4
	Скорочення та аббревіатури.....	5
	Сфера застосування.....	6
1	Нормативно-правова база щодо визначення залишків протимікробних препаратів та інших інгібуючих речовин.....	7
2	Терміни та визначення.....	13
3	Стратегія виявлення залишків протимікробних препаратів та інших інгібуючих речовин.....	17
3.1	Загальні вимоги до відбору зразків сирого молока на залишки протимікробних препаратів та інших інгібуючих речовин.....	21
3.2.	Скринінгові методи визначення залишків протимікробних препаратів та/або інших інгібіторів.....	22
3.2.1.	Якісні скринінгові методи.....	22
3.2.2.	Кількісні та напівкількісні скринінгові методи.....	27
3.3.	Підтверджуючі методи визначення залишків протимікробних препаратів	30
3.4.	Швидкі тести визначення інших інгібуючих речовин	31
4.	Вимоги до аналітичних методів.....	35
4.1	Характеристики ефективності, які необхідно визначити для аналітичних методів.....	35
4.2.	Вимоги до методів скринінгу.....	37
4.3.	Вимоги до підтверджуючих методів.....	38
5.	Інтерпретація результатів.....	40
	Додаток 1	41
	Додаток 2	42
	Додаток 3	44
	Додаток 4	45
	Список використаної літератури.....	47

ВСТУП

Щоб отримати якісну та безпечну молочну продукцію, по-перше, необхідно дотримуватися належної практики ведення тваринництва та правильного застосування ветеринарних лікарських засобів для захисту здоров'я та добробуту тварин. Однак лікування повинно проводитися за призначенням фахівця (лікаря ветеринарної медицини). Рациональне використання протимікробних препаратів та належна практика (наприклад, дотримання терміну виведення препарату, рекомендована доза та курс лікування тощо) є ключовими моментами для запобігання потраплянню залишків ветеринарних препаратів у молоко.

Незважаючи на зусилля щодо запобігання забрудненню молока залишками протимікробних препаратів та інших забруднювачів, інтегроване управління молочним ланцюгом має використовувати ефективну систему виявлення для перевірки безпечності молока.

Упровадження інтегрованої системи виявлення залишків протимікробних препаратів у молоці вимагатиме: визначення чітких цілей щодо проведення досліджень, застосування відповідних методів виявлення для досягнення цілей, визначення відповідальності, щоб кожен учасник молочного ланцюга виконував свою роль на своєму власному рівні на користь усього управління ланцюгом. Така система повинна закінчуватися ефективним управлінням випадками виявлення невідповідного молока, поводження із таким молоком відповідно до вимог законодавства та визначення причин і впровадження коригувальних заходів.

Аналітична стратегія повинна враховувати поширеність та частоту використання протимікробних препаратів на молочних фермах окремих територій.

СКОРОЧЕННЯ ТА АБРЕВІАТУРИ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ГВМ – господарства з виробництва молока

Держпродспоживслужба – Державна служба України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів

ЄС – Європейський Союз

ЗУ – Закон України

ІФА – імуноферментний метод

Мінагрополітики – Міністерство аграрної політики та продовольства України

МДР – максимально допустимий рівень

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я України

мг/кг – міліграми в кілограмі

ОГ – оптична густина

ПЗМ – пункт заготівлі молока

УФД – ультрафіолетовий детектор

ФАО – Продовольча та сільськогосподарська організація Організації об'єднаних націй

ФД – флуорисцентний детектор

ADI – допустима добова норма споживання

АОАС – Association of Official Analytical Collaboration (Міжнародна асоціація офіційної аналітичної співпраці)

CVMP – Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (Комітет із лікарських засобів для застосування у ветеринарії)

ДМД – діодно-матричний детектор

СС α – межа прийняття рішення для підтвердження

СС β – здатність виявлення для скринінгу

LOD – межа виявлення

РВР – пеніцилін зв'язувальні білки

РРА – контрольна точка дії

СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Метою цих рекомендацій є надання рекомендацій щодо визначення залишків протимікробних лікарських засобів та інших інгібуючих речовин у молоці в межах програми контролю сирого молока, щоб забезпечити якість та безпечність молочних харчових продуктів для споживачів.

Сфера застосування рекомендацій поширюється на господарства з виробництва молока, пункти заготівлі молока, операторів ринку з переробки молока та фахівців компетентного органу, залучених до перевірки дотримання законодавства щодо виробництва сирого молока та/або молозива, стану здоров'я тварин та використання ветеринарних препаратів, контролю якості та безпечності молочної продукції, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та здобувачів вищої освіти зі спеціальностей 211 «Ветеринарна медицина» і 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза».

1. НОРМАТИВНО-ПРАВОВА БАЗА ЩОДО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ІНШИХ ІНГІБУЮЧИХ РЕЧОВИН

Імплементация угоди про асоціацію між Україною та Європейським Союзом передбачає наближення національного законодавства, зокрема в частині санітарних та фітосанітарних заходів, до спеціальних гігієнічних правил для харчових продуктів тваринного походження, які встановлені Регламентом Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 853/2004 від 29 квітня 2004 року [20]

Так, 12 липня 2019 р. набрав чинності наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України (Мінагрополітики) «Про затвердження Вимог до безпечності та якості молока і молочних продуктів» від 12 березня 2019 року №118, що зареєстрований в Міністерстві юстиції України 07 червня 2019 р. за №593/33564 (далі – Наказ №118/2019) зі змінами, яким встановлюються спеціальні гігієнічні вимоги для операторів ринку молока та молочних продуктів, що еквівалентні вимогам ЄС, а саме Розділу IX, Додатку III, Регламенту Європейського Парламенту та Ради (ЄС) №853/2004 від 29 квітня 2004 року. Наказ №118/2019 визначає правову та технічну основу для розробки та впровадження національної програми контролю сирого молока, що передбачає періодичні перевірки сирого молока із відбором зразків для проведення лабораторних досліджень на визначені показники, у тому числі на залишки ветеринарних препаратів та/або інших забруднюючих речовин (у тому числі інгібуючих), щодо вмісту яких встановлено законодавчі обмеження та/або у кількості, що перевищує максимально допустимі рівні в уповноважених Держпродспоживслужбою лабораторіях.

6 травня 2022 року набрав чинності наказ Мінагрополітики «Про затвердження Гігієнічних вимог до дрібнотоварного виробництва та обігу молока» від 07 квітня 2022 року №209, зареєстрований у Міністерстві юстиції України 25 квітня 2022 року за №452/37788 (далі – Наказ №209/2022). Цим нормативно-правовим актом встановлюються гігієнічні вимоги до первинного виробництва та обігу молока від сільськогосподарських тварин, які утримуються дрібнотоварними виробниками, а також до пунктів заготівлі молока.

Дотримання вимог до безпечності та якості молока і молочних продуктів, що затверджені Наказами №118/2019 та №209/2022, перевіряється відповідно до статті 40 Закону України «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин» (далі – ЗУ 2042). Відповідно до вимог ЗУ 2042, Держпродспоживслужба зобов'язана здійснювати моніторинг впровадження оператором ринку процедур періодичної перевірки сирого молока та результатів лабораторних досліджень (випробувань). Також ЗУ 2042 запроваджено прозору

систему та простежуваність у частині ведення записів та обміну даними щодо результатів лабораторних досліджень (випробувань) з використанням інформаційно-комунікаційної системи Держпродспоживслужби («Молочний модуль»).

Господарства, де утримуються тварини, які використовуються для виробництва сирого молока та/або молозива, підлягають державному контролю з метою перевірки дотримання законодавства щодо виробництва сирого молока та/або молозива, стану здоров'я тварин та використання ветеринарних препаратів.

Важливим критерієм безпечності молока є відсутність залишків протимікробних препаратів та інших інгібуючих речовин, щодо вмісту яких встановлено законодавчі обмеження та/або кількість яких не повинна перевищувати максимально допустимі рівні, регламентовані законодавством (наказом Міністерства охорони здоров'я України (МОЗ) від 23.12.2019 №2646 Про затвердження Показників безпечності харчових продуктів "Максимальні межі (рівні) залишків діючих речовин ветеринарних препаратів у харчових продуктах тваринного походження» (далі – Наказ МОЗ №2646/2019)), тобто впроваджені оператором ринку процедури мають забезпечити, щоб сире молоко не використовували для виробництва харчових продуктів, якщо воно містить залишки таких речовин. Частота відбору зразків і проведення досліджень за цими критеріями визначається оператором ринку на рівні господарства або групи господарств, така частота не може бути нижчою, ніж передбачена чинним законодавством. Змінами до Наказу №118/2019 встановлюється мінімальна періодичність досліджень на виявлення залишків ветеринарних препаратів та/або інших забруднюючих речовин: не рідше одного разу на місяць. У разі виявлення у молоці залишків протимікробних препаратів та інших інгібуючих речовин обіг такого молока чи молозива забороняється.

Слід пам'ятати, що частота повинна встановлюватися таким чином, щоб забезпечити достовірність інформації і, як мінімум, забезпечити коригувальні дії у випадку, якщо за результатами досліджень виявлено відхилення, щоб потенційно небезпечні харчові продукти/сировина, виготовлені за період з останнього позитивного результату тестування, не вийшли за межі контролю оператора ринку.

Крім того, згідно з частиною другою статті 20 Закону України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів» оператори ринку, серед іншого, зобов'язані розробляти, вводити в дію та застосовувати постійно діючі процедури, що засновані на принципах системи аналізу небезпечних факторів та контролю у критичних точках, забезпечувати простежуваність. Тому оператори ринку (переробники молока) повинні здійснювати вхідний контроль молока-сировини на інгібітори, у тому числі на залишки протимікробних препаратів з метою недопущення потрапляння цих

речовин до готового продукту. Згідно з частиною шостою статті 20 ЗУ №771/97, оператор ринку взаємодіє із компетентним органом для здійснення заходів щодо запобігання виникненню або зменшенню ризиків, що становлять харчові продукти, які він ввів або вводить в обіг.

Країни в усьому світі покладаються на національні регулюючі органи та міжнародні комітети в оцінці безпеки всіх препаратів, які використовуються для продуктивних тварин, щодо потенційного ризику для здоров'я людини, що є невід'ємною частиною процесу реєстрації ліків. Codex Alimentarius і об'єднана програма ФАО/ВООЗ розробляють стандарти щодо залишків у харчових продуктах з 1985 року. Ці стандарти базуються на наукових оцінках, проведених об'єднаним комітетом експертів ФАО/ВООЗ з харчових добавок (JECFA), що визначає допустимі добові норми споживання (ADI) і надає рекомендації щодо максимально допустимих рівнів залишків (МДР). Отже, у країнах ЄС схвалення антибіотика або сульфаніаміду для лікування сільськогосподарських тварин вимагатиме фіксації ADI, розробки відповідного методу виявлення та встановлення періоду витримки на основі виявлених залишків (ADI/ МДР).

Для міжнародної реєстрації ветеринарних препаратів у ЄС створено Комітет з лікарських засобів для ветеринарного використання (CVMP). Базуючись на оцінці токсикологічних залишків, CVMP встановлює рівні МДР для фармакологічно активних хімічних агентів ветеринарних лікарських засобів, які містяться в харчових продуктах. Встановлення рівня МДР у ЄС регулюється Регламентом Ради (ЄС) 37/2010. Усі ветеринарні препарати на європейському ринку, призначені для продуктивних тварин, повинні пройти токсикологічну оцінку та класифікуватися в Додатках I–IV залежно від типу МДР.

МДР представляють міжнародно визнані рівні, які визначають максимальну кількість залишків препарату, що можуть бути визначені в харчових продуктах тваринного походження. Відповідно до Регламенту Комісії ЄС №1662/2006, оператори ринку харчових продуктів повинні запровадити процедури, які гарантують, що сире молоко не буде вводитися в обіг, якщо воно містить залишки протимікробних препаратів у кількостях, що перевищують рівні для будь-якої з діючих речовин, дозволених у додатках I та III Регламенту (ЄС) №2377/90, або якщо загальний вміст усіх залишків протимікробних препаратів перевищує максимальні рівні залишків.

Оператори молочного ланцюга повинні дотримуватись вимог нормативних актів відповідних країн, куди буде реалізований молочний продукт, у тому числі вимог, які висуваються до молока-сировини, або державних нормативно-правових актів [13], та відповідати встановленим рівням щодо залишків діючих речовин протимікробних препаратів.

Відповідно до плану заходів з виконання угоди про асоціацію між Україною, з однієї сторони, та ЄС, Європейським співтовариством з атомної енергії і їхніми державами-членами, з іншої сторони, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 25 жовтня 2017 року №1106 в Україні імплементовано Регламент комісії ЄС №2377/90 і затверджено Наказом МОЗ №2646/2019 максимальні межі (рівні) залишків діючих речовин ветеринарних препаратів у харчових продуктах тваринного походження. (таблиця 1).

Таблиця 1

Максимально допустимі рівні залишків протимікробних препаратів для молока сирого [13]

Групи речовин, що підлягають контролю	Діюча речовина	Максимально допустимі рівні залишків, мкг/кг
1	2	3
Хлорамфенікол	Хлорамфенікол	*
Бета-лактами	Амоксицилін	4
	Ампіцилін	4
	Бензилпеніцилін	4
	Диклоксацилін	30
	Клоксацилін	30
Бета-лактами	Нафцилін	30
	Оксацилін	30
	Цефакетрил	125
	Цефалоніум	20
	Цефоперазон	50
	Цефквіном	20
	Цефтіюфур	100
	Цефалексин	100
	Цефуроксим	*
	Цефепірін	60
	Цефазолін	50
Тетрацикліни	Доксициклін	*
	Хлортетрациклін	100
	Окситетрациклін	100
	Тетрациклін	100
Сульфонаміди	Сульфатіазол	100
	Сульфадиметоксин	100
	Сульфагуанідин	100
	Сульфадіазин	100
	Сульфамеразин	100
	Сульфаметазин (Сульфадімедін)	100

1	2	3
Сульфонаміди	Сульфаметоксипіридазин	100
	Сульфаметоксазол	100
	Сульфаніламід	100
	Сульфобензамід	100
	Сульфабромометазин	100
	Сульфацетамід	100
	Сульфахлоропіридазин	100
	Сульфадоксин	100
	Сульфаєтоксипіридазин	100
	Сульфапірідин	100
	Сульфаквіноксалін	100
	Сульфатроксазол	100
Лінкозаміди	Лінкоміцин	150
	Пірліміцин	100
Макроліди	Еритроміцин	40
	Олеандоміцин	*
	Спіраміцин	200
	Тилозин	50
	Тілмікозин	50
Аміноглікозиди	Апраміцин	*
	Стрептоміцин	200
	Дигідрострептоміцин	200
	Гентаміцин	100
	Канаміцин	150
	Неоміцин	1500
	Спектиноміцин	200
Квінолони	Енрофлоксацин	100
	Данофлоксацин	30
	Флюмеквін	50
	Маброфлоксацин	75
	Обріфлоксацин	*
	Норфлоксацин	*
	Ципрофлоксацин	100
Діамінопіридин	Баквілопрім	30
	Тріметопрім	50
Флорфенікол	Тіамфенікол	50
	Флуорфенікол	*
Амінокумарін	Новобіоцин	50
Анзаміцин	Ріфаксімін	60
Поліпептиди	Поліміксин	*
	Бацитрацин	100
	Колістин	50

1	2	3
Стрептограмін	Вірджиніаміцин	*
Бета-лактамаз інгібітори	Клавулова кислота	200
Плеврамутилін	Тіамулін	*

Примітка: * - значення встановлене на межі прийняття рішення для підтвердження (ССα).

Методи, які використовуються для контролю протимікробних речовин, повинні забезпечувати визначення залишків цих речовин на рівні інтересу.

2. ТЕРМІНИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОНЯТЬ

Абсолютне відновлення – вихід кінцевої стадії аналітичного процесу для аналіту, поділений на кількість аналіту у вихідному зразку, виражений у відсотках [17].

Антибіотик – речовина мікробного походження чи штучно синтезована, здатна пригнічувати ріст мікроорганізмів чи спричинити їх загибель [1].

Аналіт – компонент системи, що аналізується [17].

Бета (β) помилка – ймовірність того, що перевірений зразок справді не відповідає вимогам, навіть якщо було отримано сумісний результат вимірювання [17].

Ветеринарні препарати – це спеціально розроблені фармакологічно та біологічно активні хімічні речовини для лікування та профілактики захворювань тварин.

Відтворюваність – міра мінливості результатів, коли результати випробувань отримано одним і тим же методом на ідентичних зразках, що досліджувались у різних лабораторіях різними операторами з використанням різного обладнання.

Діюча речовина – будь-яка речовина (субстанція) чи суміш речовин (субстанцій), що призначені для використання у виробництві ветеринарного препарату і є його активним фармацевтичним інгредієнтом.

Збіжність – міра мінливості результатів вимірювань за умов, коли незалежні результати випробувань отримані тим самим й методом на ідентичних досліджуваних зразках у тій самій лабораторії тим самим оператором з використанням того самого обладнання протягом коротких інтервалів часу.

Здатність виявлення для скринінгу (СС β) – найменший вміст аналіту, який може бути виявлений або кількісно визначений у зразку з імовірністю помилки β [17].

У випадку заборонених або несанкціонованих фармакологічно активних речовин, СС β – це найнижча концентрація, при якій метод здатний виявити або кількісно визначити зі статистичною достовірністю $(1 - \beta)$ зразки, що містять залишки заборонених або несанкціонованих речовин.

У випадку дозволених речовин, СС β – це концентрація, при якій метод здатний виявити концентрації, нижчі за допустимий рівень, зі статистичною вірогідністю $(1 - \beta)$.

Інгібітори – речовини хімічної природи, які гальмують ріст мікроорганізмів чи утворення продуктів їх метаболізму [1].

Кількісний метод – аналітичний метод, який визначає кількість або масову частку речовини так, щоб її можна було виразити як числове значення відповідних одиниць [17].

Критерії ефективності – вимоги до характеристики ефективності, згідно з якою можна оцінити те, що аналітичний метод підходить для використання за призначенням і забезпечує надійні результати [17].

Максимально допустимий рівень (МДР) – максимальний допустимий рівень (концентрація) забруднюючої речовини у харчовому продукті, який є законодавчо дозволеним та допустимим для такого продукту. Він заснований на типі та кількості залишків, які вважаються такими, що не становлять токсикологічної небезпеки для здоров'я людини, як виражено прийнятною добовою нормою споживання, або на основі тимчасової добової норми споживання, яка враховує додатковий коефіцієнт безпеки. МДР може бути зменшений для відповідності належній практиці використання ветеринарних препаратів та ступеню доступності практичних аналітичних методів.

Межа виявлення (LOD) – найнижча концентрація речовини, яку можна достовірно виявити за допомогою цього аналітичного методу у межах встановленого довірчого діапазону. Для якісних тестів LOD – це рівень концентрації, при якому виявляється певний відсоток зразків, що містять залишки цієї діючої речовини, наприклад 95%, разом із відповідним рівнем довіри.

Межа прийняття рішення для підтвердження (СС α) – межа, при якій і вище якої можна зробити висновок з імовірністю помилки α , що зразок не відповідає вимогам законодавства, а значення $(1 - \alpha)$ означає статистичну вірогідність у відсотках того, що дозволена межа була перевищена [17].

Скринінгові методи – методи, які використовуються для виявлення присутності речовини або класу речовин на рівні інтересу. Ці методи мають високу пропускну здатність і використовуються для дослідження великої кількості з метою виявлення потенційно невідповідних зразків.

Нормативні ліміти – харчове законодавство визначає як максимально допустимі рівні залишків у продуктах харчування.

Підтверджуючі методи – методи, які надають повну або додаткову інформацію, що дозволяє ідентифікувати речовину і якщо необхідно, кількісно оцінити на рівні [17]:

- максимального допустимого рівня для дозволених речовин;
- контрольної точки дії (RPA) щодо заборонених або несанкціонованих речовин;
- настільки низької концентрації, наскільки це аналітично досяжно для забороненої або несанкціонованої речовини, для якої не встановлено контрольної точки дії.

Період очікування (каренції) – мінімальний період часу, який повинен пройти між останнім введенням або застосуванням ветеринарного препарату та отриманням їстівних продуктів від тварин, які зазнавали лікування, що забезпечує

відповідність вмісту залишків ветеринарних препаратів у харчових продуктах на максимально допустимому рівні (нормативному ліміті).

Похибка альфа (α) – ймовірність того, що перевірений зразок є відповідним, навіть якщо було отримано невідповідний результат дослідження [17].

Прецизійність – міра близькості результатів між собою. Зазвичай її виражають статистичними параметрами, що характеризують розсіяння результатів і виражають через збіжність і відтворюваність.

Правильність – близькість відповідності між середнім значенням, отриманим із великої серії результатів тестування, та прийнятим еталонним значенням. Цю оцінку зазвичай кількісно виражають через "зсув".

Протимікробні ветеринарні лікарські засоби – ветеринарні лікарські засоби, які у своєму складі містять речовини природного або синтетичного походження, що мають бактеріостатичну та бактерицидну дію [9].

Рівень інтересу означає концентрацію діючої речовини / аналіту у зразку, яка є значущою для визначення його відповідності до:

- максимального допустимого рівня для дозволених речовин встановлених Наказом МОЗ №2646/2019 [13];
- контрольної точки дії (RPA) щодо заборонених або несанкціонованих речовин встановленої Регламентом (ЄС) 2019/1871;
- концентрації настільки низької, наскільки аналітично досяжна для забороненої або несанкціонованої речовини, для якої не встановлено контрольної точки дії.

Спектр – це діапазон речовин, які можуть бути виявлені тестом. Є тести націлені на кілька класів антибіотиків, велику кількість діючих речовин, інші ж є більш специфічними.

Специфічність – здатність методу розрізнати аналіт, що вимірюється, та інші речовини. Статистична ймовірність того, що зразок, який не містить залишків цільового аналіту, буде правильно ідентифікований як негативний, виражається як частка істинно негативних результатів до загальної кількості істинно негативних і хибнопозитивних результатів. Це означає здатність тесту виявляти лише відповідний(і) залишок(и).

$$\text{Специфічність} = \frac{\text{Істинно негативні}}{(\text{Істинно негативні} + \text{хибно позитивні})}$$

Сульфаніламід – група синтетичних антибактеріальних препаратів, що використовуються для боротьби з бактеріальними інфекціями, впливаючи на ріст і розмноження бактерій шляхом порушення синтезу фолієвої кислоти, необхідної для бактерій.

Стійкість – сприйнятливість аналітичного методу до змін експериментальних умов, за яких метод може бути застосований у представленому вигляді або з визначеними незначними модифікаціями.

Точність – близькість відповідності між результатом тесту та прийнятим істинним еталонним значенням, визначеним шляхом оцінки правильності та прецизійності [17].

Чутливість тесту – це ймовірність того, що тест буде позитивним для зразків, які містять залишки цільового аналіту.

$$\text{Чутливість} = \frac{\text{Істинно позитивні}}{(\text{Істинно позитивні} + \text{хибно негативні})}$$

Якісний метод – аналітичний метод, який виявляє або ідентифікує речовину або групу речовин на основі її хімічних, біологічних або фізичних властивостей [17].

3. СТРАТЕГІЯ ВИЯВЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ІНШИХ ІНГІБУЮЧИХ РЕЧОВИН

Безпечність та якість молочних продуктів є відповідальністю кожного в молочному ланцюзі.

На фермі молоко від кожної індивідуальної тварини потрапляє до резервуару, де змішується з молоком від інших тварин. Після чого молоко завантажується в цистерни, контейнери, резервуари чи інші ємності для молока та доставляється на молокопереробне підприємство.

Проміжним етапом може бути випадок, коли сире молоко доставляється до пункту заготівлі молока, де зберігається в резервуарі пункту заготівлі, після чого доставляється на молокопереробну потужність.

Тобто з кожним кроком обсяг молока збільшується завдяки операціям збору молока. Тим часом відповідальність за якість та безпечність переходить від продавця до покупця відповідно до правил торгівлі та власності. Крім того, якість молока також розглядається як накопичення ефектів.

Відбір зразків та дослідження відіграє важливу роль у цих обмінах. Вони надають суттєву підтримку в перевірці нормативної або договірної якості (Рис. 1).



Рис. 1. Точки відбору зразків сирого молока при взаємовідносинах між операторами ринку з виробництва, заготівлі та зберігання молока та операторами ринку з переробки молока:

А – між дрібнотоварними виробниками молока та ПЗМ,

Б – між ПЗМ та молокопереробною потужністю,
 В – між ГВМ та молокопереробною потужністю,
 Г – відбір зразків сирого молока від індивідуальних корів (програми виявлення прихованих форм маститів, дослідження щодо стану здоров'я тварин, тощо).

Обов'язок оператора ринку – виробляти безпечне молоко шляхом забезпечення здоров'я тварин і персоналу, дотримання гігієни при доїнні та утриманні тварин, належного використання ветеринарних препаратів тощо. Сире молоко повинно відповідати допустимим рівням критеріїв, встановлених Наказом №118/2019. Оператор ринку зобов'язаний розробити та впровадити процедури періодичної перевірки сирого молока. Зразки сирого молока повинні бути відібрані уповноваженою Держпродспоживслужбою особою (делегатом відбору зразків: інспектором, представником лабораторії або уповноваженим ветеринаром) та досліджені (випробувані) в уповноваженій Держпродспоживслужбою лабораторії (Рис. 2), яка повідомляє оператора ринку та інспектора Держпродспоживслужби про результати лабораторних досліджень (випробувань) через інформаційно-комунікаційну системи Держпродспоживслужби («Молочний модуль») (Рис.3). Держпродспоживслужба зобов'язана здійснювати моніторинг впровадження процедур періодичної перевірки сирого молока та результатів лабораторних досліджень (випробувань).



Рис. 2. Точки відбору зразків сирого молока при взаємовідносинах між операторами ринку з виробництва, заготівлі та зберігання молока та компетентним органом

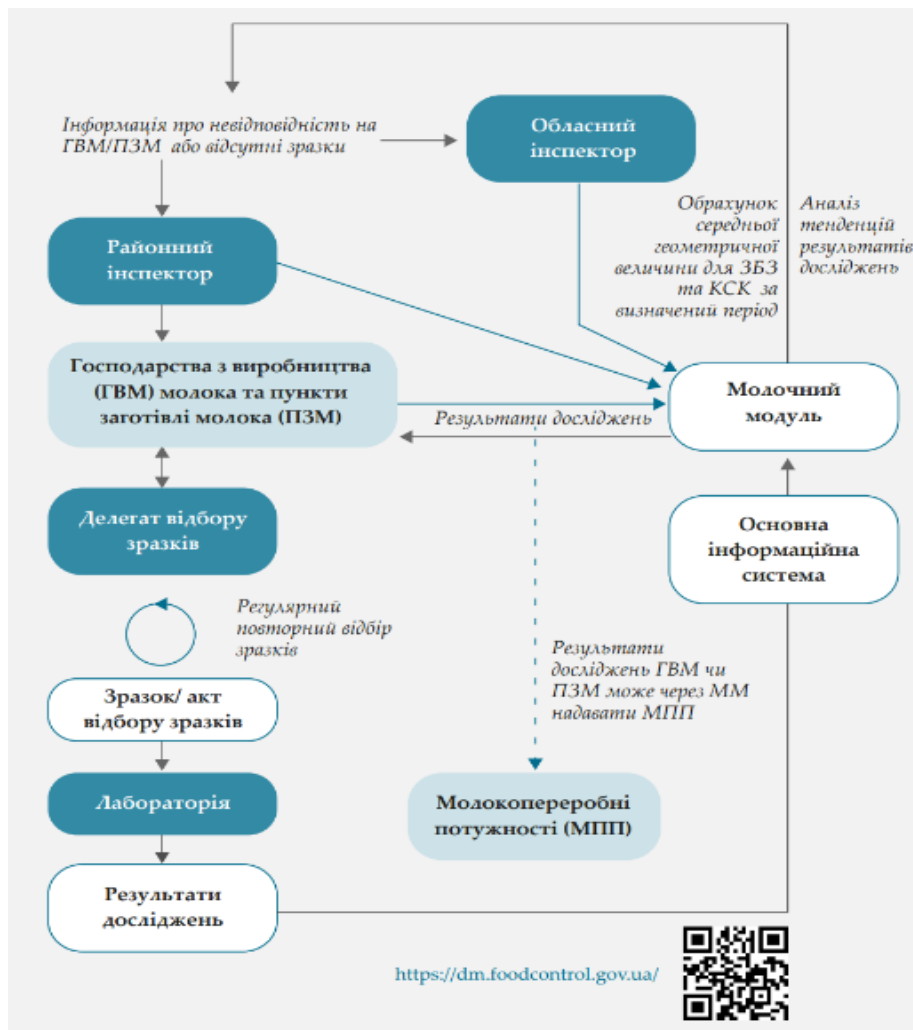


Рис. 3. Схема організації державного контролю зразків сирого молока в межах програми контролю сирого молока із використанням інформаційно-комунікаційної системи Держпродспоживслужби («Молочний модуль»)

Метою проведення досліджень на виявлення залишків протимікробних препаратів, у тому числі інших інгібіторів, у межах державного контролю (програми контролю сирого молока) та з боку молокопереробних потужностей є:

- виявлення забруднених партій молока, щоб уникнути подальшого змішування з відповідними партіями, запобігти переробці такого молока;
- перевірити дотримання вимог у межах схем оплати молока та дотримання партнерських угод;
- перевірки відповідності вимогам закупівлі молока або проміжних продуктів між операторами молочного ланцюга (наприклад, між дрібнотоварним виробником та пунктом заготівлі молока);
- перевірити та продемонструвати відповідність законодавчим вимогам у межах реалізації програми контролю сирого молока (Рисунок 2, 3) та/або на виконання плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та

забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження;

– перевірити відповідність МДР сирого молока щодо вмісту залишків протимікробних ветеринарних препаратів після їх застосуванням тварині(ам) на наступний день після завершення періоду каренції перед тим, як вносити отримане від таких тварин молоко до загальної ємності (Рисунок 1 Г).

Законодавством встановлено проведення планових щомісячних досліджень зразків сирого молока в межах програми контролю сирого молока скринінговими методами. Також тварини, які використовуються для виробництва сирого молока та/або молозива, мають бути оглянуті з періодичністю не менше одного разу на місяць та за необхідності, проведенню діагностичних заходів, що здійснюються державним ветеринарним інспектором або уповноваженим ветеринаром, з метою перевірки дотримання законодавства щодо виробництва сирого молока та/або молозива, стану здоров'я тварин та використання ветеринарних препаратів, та у разі обґрунтованої підозри, коли:

- встановлено прямий зв'язок між застосуванням протимікробного ветеринарного препарату до тварин, молоко яких було внесено до загальної ємності із молоком;
- оператор машинного доїння не має достатньо інформації щодо ідентифікації тварин, які знаходяться на лікуванні, або в періоді каренції та не здатен відрізнити їх;
- у оператора ринку відсутня процедура відокремлення тварин, які зазнають лікування або перебувають у періоді каренції після лікування, та доїння їх у окрему ємність;
- виявлено навмисні, або помилкові методи введення, збільшення дозування, кратності введення, або зменшення періоду каренції, зазначеному у листівці-вкладці до ветеринарного препарату, який було застосовано для тварини/тварин;
- підозра щодо використання не рекомендованих для доїльного або охолоджувального обладнання миючих та/або дезінфікуючих засобів, не дотримання процедури промивання обладнання чистою водою після проведення миття та дезінфекції;
- підтверджуючим методом проводяться лабораторні дослідження (випробування) у разі необхідності встановлення діючої речовини або групи діючих речовин, якими було забруднене молоко та/або визначення кількості цих речовин у молоці.

У результаті такого контролю залишків протимікробних ветеринарних препаратів у сирому молоці забезпечується: запобігання небажаному впливу терапевтичних доз протимікробних препаратів у молочних продуктах на здоров'я

споживача, запобігання порушенням технологічних процесів виготовлення молочних продукції.

3.1. Загальні вимоги до відбору зразків сирого молока на залишки протимікробних препаратів та інших інгібуючих речовин.

Відповідно до законодавства України, молоко повинно бути отримане з господарств від клінічно здорових, благополучних щодо інфекційних захворювань, ідентифікованих та зареєстрованих тварин. Після доїння молоко має бути профільтроване та охолоджене до температури не вище ніж 6°C. Для молока, яке буде перероблене на підприємствах не пізніше 2 год після доїння, охолодження не обов'язкове.

Молоко повинне бути натуральним, незбираним, чистим, без сторонніх, не властивих свіжому молоку присмаків і запахів. За зовнішнім виглядом та консистенцією молоко повинне бути однорідною рідиною від білого до ясно-жовтого кольору, без осаду та згустків.

Не допускається змішування молока від здорових і хворих корів та заморожування молока. Не допускається додавання молока від тварин за 7 днів до кінця лактаційного періоду та 7 днів після отелу. В молоці не допускається вміст інгібуючих речовин (мийно-дезінфікуючих засобів, консервантів, формаліну, соди, аміаку, перекису водню, антибіотиків) та різного роду фальсифікації.

Тривалість зберігання молока у виробників не повинна перевищувати 24 год за температури не вище 4°C, 18 год – за температури не вище 6°C, 12 год – за температури не вище 8°C. Цих вимог повинні дотримуватися всі оператори ринку незалежно від форми власності та підпорядкування.

Перед відбором зразка важливо якісно перемішати молоко, оскільки це впливає на достовірність результатів дослідження. Відбір зразків необхідно проводити лише у чистий посуд, найкраще використовувати спеціальні стерильні поліетиленові пакети/одноразову тару для відбору зразків та попередньо підготовлений чистий інструмент.

Після відбору зразків одразу проводиться маркування, зразки пакуються і опломбовуються (опечатуються) на місці відбору, що зазначається в акті відбору.

Відібрані зразки молока, необхідно довести до температури $0^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$ та доставити їх до уповноваженої лабораторії протягом 24 годин.

Правильність відбору зразків впливає на достовірність результатів досліджень. Відбір зразків проводиться у такий спосіб, щоб за результатами досліджень можна було охарактеризувати всю партію сирого молока [4].

3.2. Скринінгові методи визначення залишків протимікробних препаратів та/або інших інгібіторів.

До скринінгових методів визначення протимікробних препаратів та/або інших інгібіторів у сирому молоці належать якісні методи, які дають позитивні/негативні результати щодо наявності залишків протимікробних препаратів та/або інших інгібіторів у досліджуваних зразках, або кількісні методи, які дають розрахункову концентрацію діючої речовини протимікробного препарату.

Кожен з цих методів має свої переваги і недоліки (додаток 1), і їх можна використовувати окремо або в поєднанні для більш ефективного скринінгу залишків протимікробних препаратів та інших інгібіторів у сирому молоці.

3.2.1. Якісні скринінгові методи

Якісні скринінгові тести для виявлення залишків протимікробних препаратів у молоці є важливим інструментом для забезпечення якості та безпечності молочних продуктів. Вони використовуються на всіх етапах виробництва молока – від ферми до переробного підприємства, а також для державного контролю. Ці методи є відносно дешевими, надійними і забезпечують високу пропускну здатність, надаючи результати у формі "позитивно" або "негативно". Вони спрямовані на виявлення залишків протимікробних препаратів на рівні, близькому до встановлених нормативних лімітів (МДР).

Мікробіологічні методи

Мікробіологічний метод (метод дифузії в агаровий гель) із застосуванням мікробіологічних тестів: Polutest M, Polutest MS, Delvotest SP, Copan Test Single, брильянтовий-чорний редукційний тест (БРТ), Charm CowSide II (додаток 2).

Метод полягає у підтвердженні гальмування росту тестового мікроорганізму (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* - С 953) на тестовому субстраті з чутливим показником і з додаванням досліджуваного молока. Якщо досліджуване молоко містить інгібітори, то тестовий штам бактерій не розвивається і колір субстрату не змінюється. У разі відсутності інгібітора в зразку субстрат змінює колір у результаті розвитку тестових бактерій і закислення субстрату. Результати визначають візуально за зміною кольору гелю у тестовій ампулі та порівнюються до індикаторної шкали.

У методах пригнічення росту мікробів використовується стандартна культура досліджуваного мікроорганізму в рідкому або твердому середовищі, наприклад, *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* var. *mycoides* або *Streptococcus thermophilus*. Зразок молока наноситься на поверхню агару прямо або за допомогою паперового диска (методи дискової аналітичної пластини). Під час

інкубації відбувається дифузія зразка в середовище (принцип дифузії в агар), і якщо зразок містить інгібітори, відбувається зниження або повне пригнічення росту досліджуваного мікроорганізму. Залежно від методу, який використовується, присутність інгібіторів у досліджуваному зразку вказується утворенням чіткої зони інгібування навколо диска (методи дискової пластини) або зміною кольору середовища.

Методи пригнічення росту мікробів (швидкі тести з широким спектром) відрізняються за типом досліджуваного організму, індикатором, інкубаційним періодом і температурою, спектром і рівнями виявлення діючих речовин (додаток 2). Ряд виробників використовують як тестовий мікроорганізм *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus var. calidolactis*: *BR-test/AS/ Blue Star/6/7* (Enterotox Lab., Німеччина), *Charm Blue Yellow Test* (Charm Sciences Inc., США), *Delvo test SP-NT* (Gist-brocades BV, Нідерланди), *CMT – Copan milk test* (Copan Italia, Італія), *Eclipse 50* (Zeu-Inmunotec S.L., Іспанія). *Geobacillus stearothermophilus*, за даними Katz і Siewierski (1995), є унікальним тестовим мікроорганізмом за своїми властивостями, серед яких найважливішою є: здатність до швидкого росту за більш високих температур (64°C) і висока чутливість до β-лактамних антибіотиків.

Комерційно доступні мікробні тести на інгібітори відіграють важливу роль у визначенні залишків протимікробних препаратів та інгібіторів (додаток 2). Перевага цих методів полягає в тому, що вони мають широкий спектр виявлення, прості у використанні, недорогі та можуть використовуватися для скринінгу великої кількості зразків. Однак ці методи мають свої недоліки, які обмежують їх використання: вони не дозволяють ідентифікувати специфічний антибіотик (додатки 1, 4).

DELVO тест (від англ. **Detection of Low-Level Violations of Antibiotics**) – це метод, що використовується для виявлення залишків антибіотиків у молоці та молочних продуктах. Принцип методу полягає у пригніченні росту тестових мікроорганізмів під дією залишків антибіотиків.

Принцип роботи DELVO тесту базується на використанні чутливих до антибіотиків мікроорганізмів. Якщо у зразку молока присутні залишки антибіотиків, вони пригнічують ріст цих мікроорганізмів. Тестові системи часто включають агар з відповідними поживними речовинами та індикаторами, що змінюють колір у разі росту мікроорганізмів. Після інкубації на агарі оцінюється зміна кольору агару. Відсутність зміни кольору свідчить про відсутність антибіотиків у зразку, які пригнічують ріст мікроорганізмів.

Тести можна проводити без складного лабораторного обладнання. Можливість виявлення різних видів антибіотиків (додаток 2). Має високу чутливість до залишкових кількостей антибіотиків різних груп.

Діамантово-чорний редукційний тест (BRT) заснований на здатності мікроорганізмів відновлювати (редукувати) брильянтовий чорний барвник у молоці. В основу принципу дії BRT-тесту покладена чутливість особливих тест-мікроорганізмів до присутності антибіотиків та інших інгібіторів. У випадку присутності інгібуючих речовин метаболічна активність та власний ріст тест-культур зупиняється або уповільнюється. Тест BRT базується на реакції відновлення діамантового чорного, а рівень його відновлення використовується для фіксації метаболічної активності тест-мікроорганізмів забарвленням індикатором. Забарвлення індикатора змінюється від блакитного (синього) до жовтого відповідно до процесу метаболізму кислоти, що виробляє тест-культура під час її розвитку.

У випадку інкубування із молоком вільним від антибіотиків та інгібіторів тестова культура буде рости та викличе зміну забарвлення від синього до жовтого кольору. Якщо інгібуючі субстанції є присутніми в молоці, то зміни забарвлення не відбудеться за рахунок інгібуючого впливу на ріст тест – мікроорганізму.

Метод є відносно швидким і дозволяє отримати результати протягом кількох годин. Процедура тестування не потребує складного обладнання чи спеціальних навичок, що робить його доступним для використання навіть в умовах ферм.

Copan Test Single P&S

До складу CMT Single Test для визначення антибіотиків та сульфамідів входить: 100 пробірок із середовищем, спорами *Bacillus stearothermophilus* та індикатором; 100 піпеток для відбору зразків та внесення їх у тестову пробірку.

Суть методу полягає у внесенні молока до пробірки із середовищем, термостатуванні при 64,5°C протягом 3 годин. Зміна кольору на жовтий свідчить про відсутність антибіотиків. Якщо колір у пробірці змінився на жовто-фіолетовий, то результат є частково позитивним, а кількість антибіотиків у молоці є нижча за чутливість методу. Збереження фіолетового кольору через 3 години свідчить про присутність антибіотиків та інгібуючих речовин у молоці.

Біохімічні методи (рецепторного зв'язування, ферментативні)

Тести CHARМ I і II є якісними тестами мікробних рецепторів. Тест CHARМ I, розроблений для β-лактамів у молоці, був першим швидким тестом, визнаним АОАС з часом тестування 15 хв. У 1984–1985 рр. тест CHARМ I був удосконалений для визначення залишків протимікробних препаратів, окрім β-лактамів, та доповнений можливістю визначати тетрацикліни, сульфаніламід, аміноглікозиди, хлорамфенікол, новобіоцин і макроліди (додаток 2). Розширена версія тесту CHARМ I була названа тестом CHARМ CowSide II.

Тест CHARМ CowSide II базується на незворотній реакції зв'язування між функціональними групами протимікробних речовин і рецепторними ділянками на/або всередині клітин доданих мікроорганізмів. Два типи бактеріальних клітин

(*Bacillus stearotherophilus*) використовуються для забезпечення сайтів зв'язування семи сімейств протимікробних препаратів. У тестах на тетрациклін і хлорамфенікол використовується покриття з антитіл. Використовуються ¹⁴C- або ³H-мічені антибактеріальні речовини (індикаторний реагент), щоб конкурувати за сайти зв'язування. Ця конкуренція за сайти рецепторів перешкоджає зв'язуванню радіоактивно міченого антибактеріального препарату. Тобто чим більше радіоактивно міченої сполуки зв'язується, тим менше аналіту в зразку.

Під час інкубації будь-який протимікробний препарат, присутній у молоці, зв'язується зі своїм специфічним природним рецептором на бактеріальній клітині. Потім до суміші додають індикаторний реагент, зразок перемішують та інкубують. У цей час будь-які вільні рецепторні ділянки на бактеріальній клітині зв'яжуться з радіоактивно міченими протимікробними препаратами. Швидкість зв'язування вимірюється сцинтиляційним лічильником і порівнюється з позитивним і негативним контролем. Чим більша кількість протимікробних препаратів у зразку, тим менші показники демонструє прилад.

Альтернативним методом визначення антибіотиків групи β-лактамів (активних форм структури β-лактамів) є застосування **рецепторних або пеніцилін зв'язувальних білків (РВР)**, що успішно використовуються в деяких комерційних тестах (тест Biacore, тест Penzym, тест Beta Star, тест SNAP, тест Charm Safe Level і тест DELVO-X-Press і інші) для визначення залишків β-лактамічних антибіотиків.

РВР часто зустрічається в клітинних стінках бактерій. Чутливі до пеніциліну бактерії мають різні РВР, які за їх молекулярною масою можна розділити на дві групи: білки з низькою або високою молекулярною масою. Ці білки далі поділяються на підгрупи за послідовністю амінокислот. Різні РВР мають різні функції. Вони включають транспептидазу, трансглікозилазу та карбоксипептидазу активності. Низькомолекулярні РВР, ймовірно, контролюють ступінь перехресного зв'язування пептидоглікану в клітинній стінці, впливаючи на пептиди, що закінчуються d-аланіл-d-аланіном, але високомолекулярні РВР не мають цієї DD-пептидазної активності. Найбільшу увагу приділено розчинним DD-карбоксипептидазам *Streptomyces* (R61) і *Actinomadura* (R39). Під час росту бактерії виділяють внутрішньоклітинні ферменти (наприклад, R61 і R39), які, як вважають, є розчинними формами мембранозв'язаних транспептидаз, які беруть участь у синтезі клітинної стінки бактерій. Ферменти можуть діяти як карбоксипептидази і транспептидази. Природними субстратами для цих ферментів є пептиди, що закінчуються d-аланіл-d-аланіном (d-Ala-d-Ala). Пеніцилін є структурним аналогом дипептиду d-Ala-d-Ala, тому ферменти реагують з β-лактамною структурою. β-лактамічні антибіотики створюють ковалентний зв'язок із карбоксипептидазою, утворюючи дуже стабільний комплекс. Унаслідок утворення

цього комплексу пригнічується активність ферменту. Реакція є оборотною, якщо фермент вивільняється з комплексу, він має таку ж спорідненість до β -лактамного антибіотика, як і до реакції. Проте β -лактамні антибіотики розкладаються до фенілацетилгліцину та N-форміл-d-пеніциламіну.

Penzym test (UCB Bioproducts, Belgium) випускається в 2-х модифікаціях: Penzym 100 та Penzym S 100. Різниця між цими тестами полягає в тому, що Penzym S 100 є більш чутливим та відповідає вимогам максимально допустимих рівнів беталактамів у молоці, встановлених Наказом МОЗ № 2646/2019 (додаток 2).

Пензим тест – якісний ферментативний колориметричний метод для швидкого визначення β -лактамних антибіотиків у молоці. Принцип тесту заснований на встановленні рівня інактивації ферменту DD-карбоксіпептидази β -лактамними антибіотиками. Ці залишки специфічно зв'язуються з ферментом та інактивують його, перешкоджаючи формуванню клітинної стінки бактерій. Під час тесту Penzym – ліофілізований фермент *Streptomyces* DD-карбоксіпептидаза – поміщається в ампулу, в яку вноситься зразок молока. β -лактамні антибіотики, присутні в зразку, створюють стабільний комплекс з DD-карбоксіпептидазою у зразку. Ступінь інактивації ферменту залежить від кількості антибіотиків, присутніх у зразку. Після додавання планшета з реагентом, що містить синтетичний олігопептид d-аланіну та оксидазу d-амінокислоти, відбувається інший процес інкубації. Якщо зразок не містить залишків β -лактамних антибіотиків, після додавання специфічного субстрату фермент DD-карбоксіпептидаза гідролізує трипептид (Ac-I-Lys-d-Ala-d-Ala) на дипептид (Ac-I-Lys-d-Ala) з одночасним вивільненням d-аланіну (d-Ala). Кількість вивільненої d-Ala залежить від кількості активного ферменту DD-карбоксіпептидази. Вільний d-Ala далі окислюється d-амінокислотоксидазою до пірвіноградної кислоти, утворюючи перекис водню. Кінцеві продукти реакції субстрату та ферменту (пірвіноградна кислота та перекис водню) вимірюються за допомогою окисно-відновного кольорового індикатора та порівняння кінцевого кольору з кольоровою діаграмою, що надається в комплекті. Перекис водню використовується для окислення органічного окисно-відновного індикатора, який зміниться на рожево-оранжеву сполуку, що вказує на негативний результат. Якщо колір персиковий, зразок близький до межі виявлення. Якщо спостерігається жовте або жовто-оранжеве забарвлення – позитивний результат тесту – можна підозрювати, що зразок містить залишки антибіотика.

Пензим-тест дає змогу візуально визначити наявність у молоці антибіотиків групи бета-лактамів.

Хроматографічні експрес-тести

Застосування експрес-тестів **BetaStar** та **BetaStar Combo** для виявлення сумарної кількості цефтіофура (групи β -лактамів) та його метаболітів у молоці

полягає у взаємодії специфічного рецептора з бета-лактамами. Метод складається з двох етапів. На першому етапі інкубування молоко додають до певної кількості рецептора, який взаємодіє з присутніми у молоці β -лактамами. На другому етапі дають можливість суміші молока із рецептором мігрувати на індикаторний стрижень, на який нанесено смужку із біомолекул, що розпізнають рецептор. На індикаторному стрижні з'являються червоні смужки з різною інтенсивністю кольору, яка залежить від наявності у досліджуваному зразку молока антибіотиків групи бета-лактамів. Тести BetaStar та BetaStar Combo дають змогу візуально визначити наявність у молоці антибіотиків групи бета-лактамів.

Порівнюють інтенсивність зафарбованих зон, які з'явилися після інкубування у вигляді ліній на хроматографічному стрижні.

Є численні тестові набори, доступні від різних постачальників. Ці тести не є рівноцінними щодо межі виявлення, цільового охоплення протимікробних препаратів, часу аналізу, надійності, простоти використання та вартості (додатки 2, 4).

3.2.2. Кількісні та напівкількісні скринінгові методи

Кількісні методи використовуються на рівні зацікавленості. Вони забезпечують точність рівнів концентрацій. Якщо оцінка рівня забруднення достатня, можна використовувати напівкількісні методи.

Пластинкові тести є напівкількісним інгібуючими тестами, засновані на використанні конкретних штамів бактерії. Бактерії засівають на агар у чашках Петрі. Залежно від вибраних бактерій, чашковий тест буде націлений на конкретну групу антибіотиків.

Діаметр отриманої зони інгібування після інкубації дає оцінку рівня антибіотиків, присутніх у зразку. Проте точність цих методів низька.

Використовувати такі тести можна для якісного визначення залишкових кількостей визначених груп протимікробних препаратів шляхом надання позитивного або негативного результату залежно від наявності чи відсутності зони інгібування.

Імуноферментний аналіз (ІФА) – вид імунохімічного аналізу, що базується на імунологічній реакції антигену з відповідним антитілом з утворенням комплексу антиген-антитіло, для виявлення якого використовують кон'югати антигену, антитіла або обидва компоненти цієї реакції з ферментами.

Хімічно антигени є полімерами-білками, поліпептидами, полісахаридами або нуклеопротейдами. Вони мають дві фундаментальні властивості – викликають специфічну імунну відповідь і специфічно реагують з продуктами цієї відповіді (з антитілами та імунокомплементарними клітинами).

В імунохімічних методах використовують моноклональні або поліклональні антитіла. Сучасні імуноаналітичні методи досягають високої чутливості за рахунок мічення одного з реагентів – антигену або антитіла. Мітка може бути радіоізотопним, ферментним, флуоресцентним або хімічним агентом.

Неізотопні імуноаналізи, такі як ELISA (імуноферментний аналіз), FPIA (поляризаційний флуоресцентний імуноаналіз), PCIA (імуноаналіз на концентрацію частинок), PCFIA (імуноаналіз на концентрацію частинок) і моноклональні імуноаналізи, відіграють важливу роль у скринінгу антимікробних препаратів.

Найбільш часто використовуваним імунохімічним методом для експрес-діагностики залишків ветеринарних препаратів є імуноферментний аналіз (ІФА). Як ферментну мітку використовують пероксидазу хрому, лужну фосфатазу, глюкозу, ксидазу, піруватдегідрогеназу та рекомбінантну β-галактозидазу. Ці ферменти каталізують реакції, що спричиняють деградацію субстратів і утворюють кольорові продукти, які можна прочитати спектрофотометрично або візуально.

Для проведення аналізу у цьому форматі випускаються тест-набори, що містять усі необхідні для тесту компоненти, включаючи готові стандартні розчини протимікробних препаратів, розчини специфічних антитіл, кон'югату, субстрату та хромогену, буферу для розведення зразків та стоп-реагенту.

Кількісну оцінку кольорової реакції проводять у мікротитрувальних полістеролових планшетах, які входять до складу тест-набору. Однією тест системою можливо одночасно дослідити 42 зразка. Формат тест-набору розрахований також і для проведення поодиноких досліджень. Час проведення багатоступеневої реакції у мікротитрувальних полістеролових планшетах 0,7-3 год.

Будь-який варіант ІФА містить 3 обов'язкові стадії:

- стадія впізнавання тестованого з'єднання специфічним до нього антитілом, що веде до утворення імунного комплексу;
- стадія формування зв'язку кон'югату з імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування;
- стадія перетворення ферментної мітки в реєстрований сигнал.

ІФА-тести також є напівкількісними методами. Вони можуть бути специфічними для одного антибіотика (наприклад, хлорамфенікола) або для групи антибіотиків (наприклад, сульфаніламідів, тетрациклінів тощо) (додаток 2).

Якщо вони є специфічними для групи діючих речовин, тести ІФА дають приблизне значення на основі калібрування зі стандартними розчинами, що містять лише одну речовину, що належить цій групі. Оскільки не всі сполуки групи демонструють однакову перехресну реактивність до тесту, а антибіотик, присутній у зразку, не ідентифікований, результат дається як еквівалентний рівень антибіотика (наприклад, 5 мкг/л тетрациклінового еквівалента).

Більшість імунологічних тестів зазвичай проводять у лабораторії із використанням спеціального обладнання та затратою часу.

З цієї причини зростає потреба у розробці швидких і простих у виконанні тестів. Ряд імунохімічних тестів комерційно доступний у форматі наборів для багатьох препаратів.

Перспективним підходом у швидкому виявленні антибіотиків є використання формату вимірювальних смужок (пристрої з бічним потоком).

Тест на бічний потік передбачає нанесення зразка на фільтр, розташований у середині корпусу пристрою. Зразок проходить через фільтр зразка та прокладку для кон'югату. Цей кон'югат містить мічене антитіло, специфічне для досліджуваного аналіту. Антимікробні препарати, якщо присутні, утворюють комплекс із кон'югатом і далі повільно мігрують до мембрани в тестовій зоні. Ця зона містить іммобілізоване антитіло, специфічне для аналізу, але переважно не конкуруюче з кон'югованим антитілом за той самий або суміжні епітопи. Таким чином, тестова лінія захопить мігруючий аналізований кон'югатний комплекс. Інтенсивність тестової лінії добре корелює з кількістю аналіту в зразку. Це дослідження може бути чутливим, специфічним для групи, точним і може забезпечувати засіб для швидкого скринінгу зразків на антибіотики.

Експрес-тести дозволяють отримати результати протягом декількох хвилин і мають високу специфічність. Вони можуть бути як широкого спектру, що охоплюють декілька груп препаратів, так і більш специфічними, здатними точно визначати декілька діючих речовин в межах однієї групи.

Більшість експрес-аналізів спрямовані на виявлення β -лактамних антибіотиків. Однак навіть у цих тестах можуть виникати хибно позитивні результати. Для забезпечення безпеки сирого молока для здоров'я у загальному моніторингу слід комбінувати різні методи. Нова тенденція полягає у розробці швидких тестів для виявлення ширшого спектру антибіотиків, наприклад, таких, що дозволяють виявляти β -лактамні та тетрациклінові антибіотики.

Мікробіологічні методи визначення залишків ветеринарних препаратів мають кілька переваг, які роблять їх економічно вигідними та доступними для широкого застосування. Мікробіологічні методи зазвичай використовують дешевші реактиви та середовища та не вимагають дорогого обладнання. Це суттєво знижує загальні витрати на проведення аналізів, вони не потребують спеціальної підготовки персоналу для роботи з високотехнологічним обладнанням, що спрощує процес впровадження та використання.

Проте мікробіологічні методи мають свої обмеження. Основне з них – це чутливість та специфічність, які можуть бути нижчими порівняно з ІФА та іншими сучасними методами аналізу. Ці методи не завжди дозволяють досягти необхідної чутливості для деяких протимікробних препаратів на рівнях, визначених МДР

(додаток 2). Таким чином, мікробіологічні методи є важливим інструментом у первинному скринінгу залишків протимікробних препаратів завдяки їх низькій вартості та простоті виконання. Однак для підтвердження результатів і забезпечення їхньої достовірності необхідно використовувати підтверджуючі методи, такі як високоефективна рідинна хроматографія з флуорисцентним та маспектрометричним детекторами [17].

Підтверджуючі методи забезпечують вищу точність та чутливість і зменшують кількість хибнопозитивних результатів, що може призвести до невиправданих економічних витрат та необґрунтованих рішень, визначають кількісний вміст залишків протимікробних препаратів у молоці, що дозволяє порівняти із встановленими МДР для дозволених до використання ветеринарних лікарських препаратів.

3.3. Підтверджуючі методи визначення залишків протимікробних препаратів.

Фізико-хімічні методи є кількісними методами і засновані на хроматографічному розділенні і виявленні за допомогою УФД, ДМД або ФД. Точність цих методів є високою.

Високоефективна рідинна хроматографія – це метод розділення багатокомпонентної суміші на індивідуальні компоненти між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а інша рухома, з наступним детектуванням аналітичного сигналу кожного компонента. Ідентифікацію піків на хроматограмі проводять за часом утримання піку на хроматограмі градуовального розчину. Кількісне визначення здійснюють за методом стандартних добавок.

Для вибору відповідного режиму виявлення сполуки важливо взяти до уваги такі параметри: хімічна природа досліджуваних речовин, потенційні перешкоди, межа виявлення, межа кількісного визначення, діапазон лінійності, доступність детектора. Для визначення протимікробних препаратів використовують два типи детекторів: флуоресцентний і ультрафіолетовий.

Флуорисцентний детектор (ФД) вимірює лише флуоресцентні сполуки. Для підвищення специфічності аналізу можливо додавання флуоресціюючих реагентів (дериватів), щоб утворилося флуоресцентне похідне, яке може бути селективно виявлено серед інших розчинених речовин.

Високоефективна рідинна хроматографія з маспектрометричним детектуванням (LC-MS/MS) метод визначення хімічного, фазового складу і молекулярної структури речовини, що базується на реєстрації спектра мас іонів, утворених внаслідок іонізації атомів і (або) молекул зразка. Маса іона визначається за його відхиленням у магнітному полі.

Метод заснований на визначенні відношення маси до заряду іонів, що утворюються при іонізації компонентів проби. Отримані при іонізації іони за допомогою електричного поля переносяться в мас-аналізатор. Там починається другий етап мас-спектрометричного аналізу — сортування іонів за масами (точніше за відношенням маси до заряду, або m/z).

Переваги методу в селективному високочутливому одночасному визначенні великої кількості компонентів єдиною процедурою пробопідготовки для об'єктів різної природи. Точне визначення маси аналізованої молекули дозволяє визначити її елементний склад. Найважливішими технічними характеристиками мас-спектрометрів є чутливість, динамічний діапазон, роздільність, швидкість сканування.

3.4. Швидкі тести визначення інших інгібуючих речовин

Для поліпшення показань у молоко часто додають бікарбонат натрію, гідроксид натрію, карбонат натрію або гашене вапно.

На якість молока і молочних продуктів впливає наявність нейтралізаторів, перекису водню, сечовини.

Додавання мила до молока приводить до нейтралізації молочної кислоти, яка виникає при трансформації лактози мікроорганізмами. В результаті відбувається зсув показника активної кислотності рН у лужне середовище. Таким чином, додавання мила в молоко дозволяє фальсифікувати молоко за титрованою кислотністю та рН.

Визначення нейтралізаторів за допомогою тест-смужки **Milk Security (Lactoscan)** призначені для швидкого і надійного визначення фальсифікації молока (таблиця 2).

При реакції з цими речовинами реагентна зона тест-смужки забарвлюється від жовто-зеленого до синьо-зеленого. Цей тест не буде ефективним, якщо пройшла реакція нейтралізації самих цих нейтралізаторів. Це відбувається при скисанні молока, і тоді тест буде негативним. У разі лужної реакції молока на присутність слідів соди рекомендується використовувати й інші методи.

Визначення перекису водню

У молочній промисловості ніяк не обійтися без дезінфікуючих засобів. Поряд з хлором і діоксидом хлору як дезінфектор часто використовують перекис водню, який є більш потужним дезінфектантом. Тестування за допомогою смужок дозволяє контролювати якість молочної продукції і є гарантією того, що залишки перекису повністю видаляються з обладнання перед заливкою молока.

Реакція на перекис водню має високу ступінь чутливості. Реагентна зона смужки змінює колір від світло-жовтого (75ppm; 0,0075%) до жовто-коричневого (250ppm; 0,025%) (Рис. 4).

Визначення концентрації сечовини

Сечовина, додана в молоко, підвищує вміст сухого знежиреного молочного залишку, а також впливає на активність іонів водню і рН.

Показник наявності сечовини в молоці – зміна кольору реагентної зони від жовтого до рожево-червоного, концентрація 0,07-0,12%. Концентрація сечовини вище 0,07% у молоці є неприпустимою. При відсутності нейтралізаторів у молоці концентрація сечовини оцінюється за шкалою 1, при їх наявності – за шкалою 2 (більш інтенсивною).

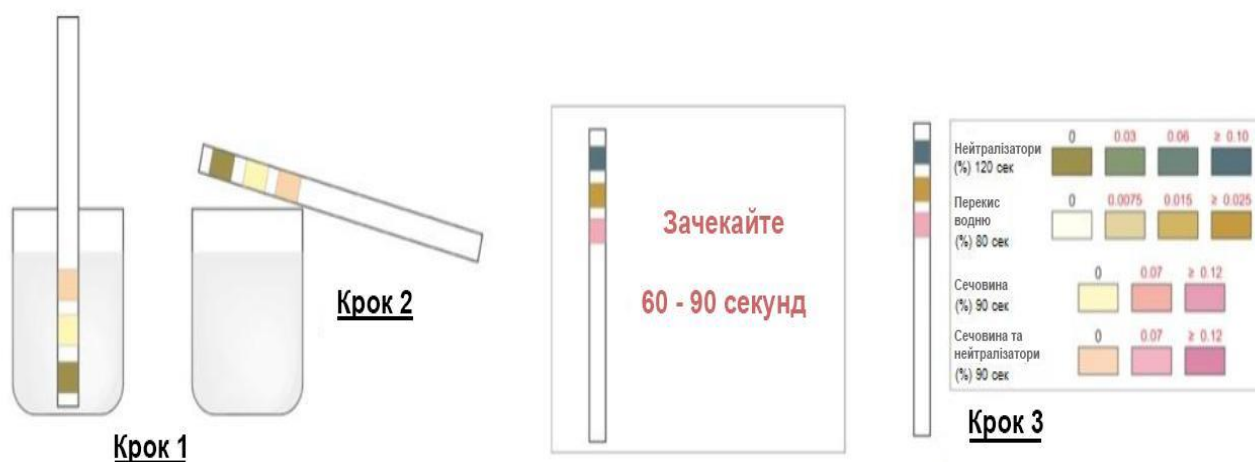


Рис. 4. Схема проведення досліджень за допомогою тест-смужки Milk Security та інтерпретація результатів.

Таблиця 2

Інтерпретація результатів аналізу за допомогою тест-смужки Milk Security

Параметри	Час зчитування	Концентрація			
		0	0.03%	0.06%	0.10%
Нейтралізатори	90 с	0	0.03%	0.06%	0.10%
H ₂ O ₂ (перекис водню)	60 с	0	75 ppm (0.005%)	150 ppm (0.015%)	250 ppm (0.025%)
Сечовина	90 с	0	0.07%	0.12%	

Визначення аміаку [3]

Наявність аміаку в молоці визначають не раніше ніж через 2 год після доїння.

Метод ґрунтується на властивості молочної сироватки, виділеної з молока зазначеним методом, змінювати колір під час взаємодії з реактивом Несслера.

Реактив Несслера – лужний розчин меркурій йодиду калію (K₂[HgI₄]), під дією якого в розчинах солей амонію утворюється червоно-бурий осад йодиду оксодимерамонію: забарвлення дослідного зразку у лимонно-жовтий колір вказує на наявність природного аміаку, характерного для молока. Поява помаранчевого

кольору суміші різної інтенсивності вказує на наявність надлишку аміаку відносно його природного вмісту. Чутливість методу становить від 0,006% до 0,009% аміаку.

Визначення соди [2]

Якісний метод ґрунтується на зміні забарвлення розчину індикатору бромтимолового синього під час додавання його в молоко, що містить соду (карбонат або бікарбонат натрію). Мінімальне значення визначеної масової частки соди становить 0,05%.

Жовте забарвлення кільцевого шару свідчить про відсутність соди в молоці. Поява зеленого забарвлення різних відтінків (від світло-зеленого до темно-зеленого) свідчить про наявність соди в молоці, тобто про те, що молоко фальсифіковане.

Кількісний метод ґрунтується на озоленні молока і визначенні лужності золи титруванням відповідно до ДСТУ 8378:2015 Молоко. Методи визначення соди [2].

Перевірка молока на фальсифікації іншими інгібіторами за допомогою набору для перевірки молока на фальсифікації (Adulteration Testing of Milk, Himedia, Індія). Набір, розроблений для виявлення найпоширеніших сімнадцяти фальсифікацій у молоці та доступний у двох частинах: частина А для перевірки 11 параметрів та частина В для 6 параметрів. Для проведення якісної реакції до 1 мл молока додають визначену інструкцією до набору кількість реагенту для окремих показників. Спостерігають за зміною кольору реакційної суміші.

Таблиця 3

Інтерпретація результатів досліджень за допомогою набору Adulteration Testing of Milk, Himedia

Параметри, що досліджуються	Статус	Зміна кольору	LOD
1	2	3	4
частина А для перевірки 11 параметрів			
Алізарин (ALZ): (кислотність і термостійкість)	Нормальне молоко	Червоний	pH 6.8
	Кислий	Червоно-помаранчевий	pH 5.8
	Лужний	Червоно-фіолетовий	pH 7.8
Формалін	Відсутність	Кільце коричнево-жовте	< 0,05 проміле
	Наявність	Коло фіолетове/ фіолетовий колір	>0,05 проміле
Сечовина	Відсутність	Від білого до злегка жовтого кольору	<0,5%
	Наявність	Жовтий	>0,5%

1	2	3	4
Крохмаль	Відсутність	Від білого до кремового	< 0,1%
	Наявність	Синій	> 0,1%
Нейтралізатори: (бікарбонат натрію, карбонат натрію та гідроксид натрію, гідроксид кальцію)	Відсутність	Світло-помаранчевий	<0,05%
	Наявність	Червонувато-рожевий	>0,05%
Миючі засоби (шампунь, пральний порошок)	Відсутність	Сіро-блакитний	<0,2%
	Наявність	Синій	>0,2%
	Наявність	Сланцево-сірий	>0,2%
Натрію хлорид	Відсутність	Цегляно-червоний	<0,1%
	Наявність	Жовтий	>0,1%
Сухе знежирене молоко	Відсутність	Зеленуватий	<2,0%
	Наявність	Синюшний	>2,0%
Цукор (сахароза)	Відсутність	Блідо жовтий	<0,5%
	Наявність	Цегляно-червоний	>0,5%
Глюкоза / Декстроза	Відсутність	Світло-зелений	<1,0%
	Наявність	Блакитно-зелений	>1,0%
Перекис водню	Відсутність	Від білого до світло-сірого	<0,05 ppm
	Наявність	Синювато-сірий	>0,05 ppm
частина В для перевірки 6 параметрів			
Целюлоза: (бавовняний лінт або корбоксиметил- целюлозо-натрієва сіль)	Відсутність	Жовтий	<2,0%
	Наявність	Колій зеленого моху	>2,0%
Мальтодекстрин/ мальтоза	Відсутність	Золотисто-жовтий	<0,2%
	Наявність	Коричневий	>0,2%
Сульфат амонію	Відсутність	Пшеничний	<0,25%
	Наявність	Бірюзово-блакитний Світло-бежевий	<=0,5% >0,5%
Сторонні білки	Відсутність	-	3-4%
	Наявність	-	>4,1%
Борна кислота	Відсутність	Колір куркуми жовтої	<0,1%
	Наявність	Червонувато-оранжевий	>0,1%
Ставкова вода / нітрати	Відсутність	Від білого до брудно-білого	<20 ppm
	Наявність	Рожево-пурпурний	>20 ppm

Примітка: інтенсивність кольору залежить від кількості інгібуючої речовини в зразку молока.

4. ВИМОГИ ДО АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДІВ

Відповідно до статті 21 Закону України «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин» встановлені для цілей державного контролю методи (методики) лабораторних досліджень (випробувань) повинні визначатися за такими критеріями:

- 1) правильність;
- 2) можливість застосування (матриця та інтервал концентрації);
- 3) межа виявлення;
- 4) межа виміру;
- 5) точність;
- 6) повторюваність (збіжність);
- 7) відтворюваність;
- 8) відновлення;
- 9) вибірковість;
- 10) чутливість;
- 11) лінійність;
- 12) похибка вимірювання;
- 13) інші критерії, які можуть бути визначені як обов'язкові центральним

органом виконавчої влади, що забезпечує формування та реалізує державну політику у сфері технічного регулювання, метрології та метрологічної діяльності.

Відповідно до Регламенту Комісії (ЄС) 2021/808 від 22 березня 2021 року [17], встановлено правила щодо методів дослідження, які використовуються для відбору зразків і лабораторних досліджень щодо залишків фармакологічно активних речовин у живих тваринах, які використовуються для виробництва харчових продуктів, частинах їх тіла та рідинах, екскрементах, тканинах, продуктах тваринного походження, побічних тваринних продуктах, кормах і воді. Він також встановлює правила для інтерпретації аналітичних результатів цих лабораторних досліджень. Дія цього Регламенту поширюється на офіційний контроль, спрямований на перевірку дотримання вимог щодо наявності залишків фармакологічно активних речовин.

4.1. Характеристики ефективності, які необхідно визначити для аналітичних методів

Шляхом валідації методу має бути продемонстровано, що аналітичний метод відповідає критеріям, застосованим для відповідних характеристик ефективності.

Основні цілі валідації можна сформулювати так [5]:

- підтвердження та забезпечення об'єктивного доказу того, що метод вимірює саме те, що повинен вимірювати, а також, що він задовольняє попередньо встановлені робочі критерії ефективності;
- оптимізація параметрів методу (наприклад, таких як розмір зразка або час сушіння тощо);
- опрацювання чи підтвердження рівняння, що застосовується для обчислення результату вимірювання;
- визначення робочих параметрів методу (характеристик ефективності).

Таблиця 4 визначає робочі характеристики, які повинні бути перевірені для кожного типу методу.

Таблиця 4

Класифікація аналітичних методів за характеристиками ефективності (робочими параметрами), які необхідно визначити

Метод	Підтвердження		Скринінг		
	якісний	кількісний	якісний	напів-кількісний	кількісний
Речовини	А	А, Б	А, Б	А, Б	А, Б
Ідентифікація	х	х			
ССα	х	х			
ССβ	-		х	х	х
Правильність (зсув)		х			х
Прецизійність (збіжність, відтворюваність)		х		(х)	х
Відносний матричний ефект/ абсолютне відновлення (*)		х			х
Селективність/ Специфічність		х	х	х	х
Стабільність (**)		х	х	х	х
Стійкість		х	х	х	х

Примітка:

х – необхідно довести за допомогою валідації, що вимоги до робочих характеристик виконуються.

(х) – вимоги щодо прецизійності не обов'язкові для напівкількісних методів скринінгу. Однак прецизійність повинна бути визначена, щоб довести придатність методу для уникнення помилкових сумісних результатів аналізу.

А – заборонені або недозволені речовини

В – дозволені речовини

(*) – застосовується до маспектрометричних методів. Абсолютне відновлення методу має бути визначено, якщо не використовується внутрішній стандарт або калібрування через збагачення матриці.

(**) – якщо дані про стабільність аналітів у матриці доступні з наукових джерел, ці дані не потребують повторного визначення у відповідній лабораторії. Але використання доступних стабільності даних є прийнятним, якщо застосовуються ідентичні умови.

4.2. Вимоги до методів скринінгу [17]

Якісні, напівкількісні або кількісні методи повинні використовуватися як відповідні методи скринінгу.

Для заборонених або несанкціонованих речовин ССВ має бути настільки низьким, наскільки це розумно досяжно, і в будь-якому випадку нижчим за контрольну точку дії (RPA) для речовин, для яких RPA встановлено Регламентом (ЄС) 2019/1871. Для дозволених фармакологічно активних речовин ССВ має бути нижчим, ніж МДР.

Для скринінгу використовуються тільки ті аналітичні методи, для яких можна документально підтвердити, що вони валідовані та мають рівень хибної сумісності, нижчий або дорівнює 5% (β -помилка).

У разі підозри на невідповідність результату цей результат має бути підтверджено підтверджуючим методом.

Кількісні методи скринінгу, які використовуються як для скринінгу, так і для підтвердження, повинні відповідати тим самим вимогам щодо точності, діапазону правильності, зазначеної в таблиці 5.

Таблиця 5

Мінімальна правильність кількісних методів [17]

Масова частка	Діапазон
≤ 1 мкг/кг	від -50% до $+20\%$
> 1 мкг/кг до 10 мкг/кг	від -30% до $+20\%$
≥ 10 мкг/кг	від -20% до $+20\%$

Примітка: Якщо відсутні сертифіковані еталонні матеріали, допустимо оцінювати правильність вимірювань іншими способами, наприклад, використовуючи матеріали з приписаними значеннями з міжлабораторних досліджень або шляхом додавання відомої кількості аналіту(ів) до порожньої матриці.

Коефіцієнт варіації (CV) для повторного аналізу еталонного або збагаченого матеріалу в умовах внутрішньолабораторної відтворюваності не повинен перевищувати рівень, розрахований за рівнянням Горвіца:

$$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

де С – масова частка, виражена як ступінь (показник) числа 10 (наприклад, $1 \text{ мкг/г} = 10^{-3}$). Для масових часток нижче 120 мкг/кг застосування рівняння Горвіца дає неприйнятно високі значення. Тобто дозволений максимальний коефіцієнт варіації не повинен перевищувати значення, наведені в таблиці 6.

Прийнятний коефіцієнт варіації в умовах відтворюваності [17]

Масова частка	Відтворюваність CV (%)
> 1000 мкг/кг	16 (відповідно до рівняння Горвіца)
> 120 мкг/кг – 1000 мкг/кг	22 (відповідно до рівняння Горвіца)
10 – 120 мкг/кг	25 (*)
< 10 мкг/кг	30 (*)

Примітка: (*) – для досліджень, проведених в умовах повторюваності, коефіцієнт варіації повинен бути рівним або нижчим за дві третини значень, наведених у таблиці 6.

4.3. Вимоги до підтверджуючих методів

Для заборонених або несанкціонованих речовин ССа має бути настільки низьким, наскільки це можливо досягнути. Для заборонених або несанкціонованих речовин, для яких РРА встановлено згідно з Регламентом (ЄС) 2019/1871, ССа має бути нижчим або дорівнювати контрольній точці дії (РРА).

Для дозволених речовин ССа має бути вищим, ніж МДР, але якомога ближче до нього.

Для цілей підтвердження, використовують лише аналітичні методи, для яких можна документально підтвердити, що вони підтверджені та мають хибний рівень невідповідності (α похибка), яка є менша або дорівнює 1% для заборонених або несанкціонованих речовин, або яка менша або дорівнює 5% для дозволених речовин.

Підтверджуючі методи повинні надавати інформацію про структурний хімічний склад аналіту. Отже, підтверджуючі методи, засновані лише на хроматографічному аналізі без використання мас-спектрометричного виявлення, самі по собі непридатні для використання як підтверджуючі методи для заборонених або недозволених фармакологічно активних речовин. У випадку, якщо мас-спектрометрія не підходить для дозволених речовин, можна використовувати інші методи, такі як високоефективна рідинна хроматографія з діодно-матричним детектором (ДМД) або флуорисцентним детектором (ФД), або їх комбінацію.

Рідинна хроматографія з УФ детектуванням (одна довжина хвилі) сама по собі не підходить для використання як метод підтвердження.

Якщо це вимагається відповідно до підтверджуючого методу, на початку процедури екстракції слід додати до зразку відповідний внутрішній стандарт. Залежно від наявності слід використовувати або стабільні мічені ізотопами форми

аналіту, які особливо підходять для мас-спектрометричного виявлення, або аналогові сполуки, які структурно тісно пов'язані з аналітом.

Якщо неможливо використати відповідний внутрішній стандарт, ідентифікацію аналіту бажано підтверджувати спільною хроматографією для покращення ідентифікації аналіту.

Приклад: Спільна хроматографія – це процедура, за якої екстракт зразка перед хроматографічним етапом(ами) поділяють на дві частини. Частина перша хроматографується як така. Частина друга змішується зі стандартним аналітом, який необхідно виміряти. Потім цю суміш також хроматографують. Кількість доданого стандартного аналіту має бути подібною до розрахункової кількості аналіту в екстракті. У цьому випадку повинен бути отриманий лише один пік, причому підвищена висота (або площа) піку еквівалентна кількості доданого аналіту.

Вимоги до хроматографічного розділення та специфічні критерії ефективності мас-спектрометрії наведено в Регламенті Комісії (ЄС) 2021/808 від 22 березня 2021 року [17].

5. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результат аналізу вважається невідповідним, якщо він дорівнює або перевищує межу прийняття рішення для підтвердження ($CC\alpha$).

Для дозволених речовин, для яких було встановлено МДР, межа прийняття рішення для підтвердження ($CC\alpha$) повинна бути концентрацією, при якій і вище якої можна прийняти рішення зі статистичною достовірністю числового значення $(1 - \alpha)$, що дозволена межа було перевищено.

Для несанкціонованих або заборонених речовин, або для дозволених речовин, для яких не було встановлено МДР для конкретного виду чи продукту, ліміт рішення для підтвердження ($CC\alpha$) має бути найнижчим рівнем концентрації, щодо якого можна прийняти рішення за допомогою статистична достовірність числового значення $1 - \alpha$, що конкретний аналіт присутній.

Для несанкціонованих або заборонених фармакологічно активних речовин помилка α повинна становити 1% або менше. Для всіх інших речовин похибка α повинна становити 5% або менше.

Порівняння критеріїв щодо використання скринінгових методів визначення протимікробних речовин

Характеристики	Якісний (позитивний/негативний)		Напівкількісний з розрахованою концентрацією	
	Мікробіологічні	Біохімічні	Біологічний	Біохімічні
Критерії для методів				
Принцип	виявляє метаболічні реакції клітин та аналітів	виявляє молекулярні взаємодії антибіотика і ліганди (антитіла або рецептори) білка	виявляє метаболічні реакції клітин та аналітів	виявляє молекулярну взаємодію між антибіотиками та лігандами (антитілами або рецепторами) білку
Тип реакції	пригнічення росту бактерій	імунологічний аналіз	пригнічення росту бактерій	імунологічний аналіз
Опис методу	інкубація з бактеріями в розчині або на чашках, або в ампулах	бічний потік, ІФА, біочіп або радіоімунологічний аналіз	пластинковий тест/ зони інгібування	специфічний ІФА
Інтерпретація результатів	візуально або доступні колориметричні зчитувальні пристрої (рН- або окисно-відновний індикатор)	візуально або колориметричні зчитувальні пристрої	вимірювання розміру зони інгібування, кількісна оцінка можлива лише за наявності відомої речовини	колориметричний (маркування) з калібрувальною кривою, зчитувач мікропланшет
Тривалість дослідження	1-3,5 год	2-10 хв - до 3 год	кілька год	2-4 год
Специфічність	не специфічний, широкого спектру (кілька діючих речовин або декілька груп протимікробних препаратів)	специфічний для одного або кількох антибіотиків або груп	не специфічний, кілька діючих речовин або декілька груп протимікробних препаратів	специфічний для одного антибіотика
Однчасне визначення спектру антибіотиків	так	так, проте не всі тести	від середнього до широкого спектру	поодинокі антибіотики
Вартість	дешево	дешево для великої кількості одночасних досліджень, дорого при дослідженні поодиноких зразків	дешево	дешево для великої кількості одночасних досліджень, дорого при дослідженні поодиноких зразків
Пробопідготовка	немає або проста	немає або проста	проста	від простої до складної
Обладнання/ складність	не потребує спеціального обладнання	просте або середнє	просте	середнє
Навички персоналу	низькі	низькі/середні	низькі	середні

Додаток 2

Порівняльна характеристика чутливості скринінгових тестів, мкг/кг

Групи речовин, що підлягають контролю	Діючі речовини, що аналізуються	Максимальні межі (рівні) залишків діючих речовин відповідно до наказу МОЗ 2646/2019	Delvo Test SP	Copan Test Single P & S	Polutest M	Polutest MS	Брильянтовий-чорний редуційний тест (БРТ)	Charm CowSide II	Penzym S 100	Рівні ССβ**, Імуноферментний аналіз (ІФА)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Хлорамфенікол	Хлорамфенікол	*	2,5-10	1000	1,0	-	5000-7500	5000-7500		0,09
Бета-лактами	Амоксицилін	4	0,002-0,005	3,5-4	-	-	2-3	3-4	3-4	2
	Ампіцилін	4	0,002-0,005	4	-	-	2-3	3-4	3-4	2
	Бензилпеніцилін	4								2
	Диклоксацилін	30	0,01-0,015	20	-	-	10-20	5-10		
	Клоксацилін	30	0,015- 0,025	25	-	-	20-30	10-25	60-100	15
	Нафцилін	30	-		-	-	10-15	4		
	Оксацилін	30	0,005-0,01	15	-	-	10-20	5-10	20-30	
	Пеніцилін	4	0,002-0,0025	2,5	0,003-0,004	-	-	2-3	2-4	
	Цефаксетрин	125	0,02-0,04	-	-	-	-	25		
	Цефалоніум	20	-	-	-	-	10-20	12-15		
	Цефоперазон	50	0,04-0,1	-	-	-	25-50	30		
	Цефквіном	20	-	-	-	-	100-200	80		10
	Цефтіюфул	100	-	50	-	-	50-100	50-100	20-40	50
	Цефалексин	100	0,04-0,1	-	-	-	200-300	>45		50
	Цефуросим	*	-	-	-	-	200-300	60		
	Цефепірин	60	0,005-0,01	10	-	-	4-5	8-10	3-5	
Цефазолін	50	-	-	-	-	10-15	6			
Піперацілін	*	-	-	-	-	10-15	-			
Тетрацикліни	Доксициклін	*	-	-	-	-	-	150		50
	Хлортетрациклін	100	0,1-0,6	100	0,1	-	-	50-100		50
	Окситетрациклін	100	0,1-0,5	150	0,1-0,2	-	500-750	75-100		50
	Тетрациклін	100	0,1-0,6	100	0,1-0,2	-	200-400	50-100		50

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Сульфонаміди	Сульфатіазол	100	0,05-0,15	50	-	0,1-0,25	200-400	50-100		50
	Сульфадиметоксин	100	0,05-0,1	50	-	0,1-0,25	500-750	25-50		50
	Сульфадіазин	100	0,05-0,1	50	-	0,25-0,5	500-750	40-60		50
	Сульфамеразин	100	-	-	-	-	-	-		50
	Сульфаметазин (Сульфадімедін)	100	0,025-0,2	125	-	0,5-1,0	500-750	75-125		50
	Сульфаметоксазол	100	-	-	-	-	-	<50		50
	Сульфацетамід	100	-	-	-	0,2-0,6	-	-		50
	Сульфадоксин	100	-	-	-	-	-	100-200		50
Лінкозаміди	Лінкоміцин	150	0,1-0,4	-	0,2-0,3	-	150-300	500-700		40
Макроліди	Еритроміцин	40	0,05-0,25	20 / 300	0,4	-	40-60	75-100		15
	Спіраміцин	200	0,2-0,75	1500	-	-	400-600	300-400		
	Тилозин	50	0,01-0,1	100/75	-	-	25-50	20-300		25
	Тілмікозин	50	-	100/75	-	-	-	75-100		
	Стрептоміцин	200	-	2000/3000	0,25-0,5	-	1000-1500	<1000		20
	Дигідрострептоміцин	200	-	2000	-	-	-	-		20
	Гентаміцин	100	0,1-0,5	250/200	-	-	200-300	75-150		30
	Канаміцин	150	2,5-7,5		-	-	-	-		75
	Неоміцин	1500	-	600/400	0,8-1,0	-	500-750	100-150		25
	Спектиноміцин	200	-		-	-	-	>300		8
	Флюмеквін	50	-		-	-	-	5000-6000		10
	Тріметопрім	50	0,05- 0,5	200	-	0,025-0,04	-	200-300		25
Флорфенікол	Тіамфенікол	50	0,0004- 0,004		-	-	-	-		
	Бацитрацин	100	-		0,1-0,2	-	-	-		
	Флуорфенікол	*								10
	Дапсон	*	-		-	0,05-0,1	-	1-2		2,5

Примітка: * - для заборонених препаратів рівень дії - результат вище встановленого рівня ССβ (для скринінгових методів), або ССа (для підтверджуючих методів);

** - рівень ССβ, встановлений при оцінці придатності імуноферментного аналізу (ІФА) на прикладі комерційних тест-систем R-biopharm, Німеччина;



- рівень чутливості методу перевищує рівень МДР для діючої речовини встановлений наказом МОЗ №2646/2019 .

Порівняльна таблиця фізико-хімічних методів визначення антибіотиків

Характеристика	Скринінговий метод	Підтверджуючий метод
Результат	кількісний з визначенням концентрації	підтверджує ідентичність і точність концентрації антибіотиків
Тип реакції	Фізико-хімічний	Фізико-хімічний
Принцип	Розділення окремих антибіотиків і фізичне виявлення	Розділення окремих антибіотиків і фізичне виявлення
Тип реакції	Хроматографія і спектрометрія	Хроматографія і масспектрометрія
Опис методу	LC-UV, LC-FL, LC-ECD, LC-MS, GC-FID	LC-MS/MS, LC-HRMS
Інтерпретація	Ультрафіолетова або флуорисцентна спектрометрія з калібрувальною кривою	Мас-спектрометрія з калібрувальною кривою
Тривалість аналізу	1-2 години	1-2 години
Специфічність	Ідентифікація і визначення окремих антибіотиків	Спектрометрична ідентифікація і визначення окремих антибіотиків
Одночасне визначення спектру антибіотиків	Від малого до середнього діапазону	Від середнього до великого діапазону
Вартість	Середній/дорогий	Дорогий
Пробопідготовка	Комплекс	Комплекс
Облаштування/складність	Середній	Високий
Навички користувача	Середні/високі	Високі
Використання	Молочний ланцюг	Готовий продукт

Якісні скринінгові тести: переваги і обмеження щодо їх використання

Тип тесту	Усі скринінгові тести на імунній або клітинній основі	Скринінгові тести, що базуються на принципі пригнічення росту мікроорганізмів	Швидкі тести з бічним потоком	Імуноферментний аналіз
1	2	3	4	5
Відповідність цілям	переконатись, що тест забезпечує визначення необхідного спектру протимікробних речовин; перевірити зазначені виробником рівні чутливості, специфічність відповідно до встановлених нормативних лімітів	неможливість визначення деяких протимікробних препаратів (наприклад, деякі аміноглікозиди, тетрацикліни, сульфаніламід)	необхідність використання декількох тестів: поодинокі або декілька груп речовин. Іноді не всі сполуки в групі виявляються на рівні або нижче рівня інтересу	1. загальний - спрямований на одну групу антибіотиків. Відповідь окремих антибіотиків як відсоток перехресної реактивності. 2. специфічний спрямований на виявлення однієї діючої речовини (для заборонених протимікробних препаратів)
Критичні фактори	температурний режим зберігання, час інкубації	людський фактор при візуальному зчитуванні	людський фактор при візуальному зчитуванні	підготовка зразків: встановлення повернення аналіту шляхом дослідження еталонних зразків або шляхом додавання в чисте молоко визначеного аналіту
Сильні сторони	-	широкий спектр визначення протимікробних препаратів	дуже швидкий тест	забезпечує розрахунок концентрації аналіту
Контроль / Запобіжні заходи	чітке дотримання інструкцій виробника, використання позитивного і негативного контролю для перевірки правильності виконання тесту	контроль за термінами придатності (здатність виявлення змінюється під час зберігання). Негативний контроль - чисте молоко. Позитивний контроль - надається виробником або готується шляхом додавання в чисте молоко відповідних діючих речовин.	негативний контроль - чисте молоко, позитивний контроль - надається виробником або готується шляхом додавання в чисте молоко відповідної діючої речовини	позитивний стандартний зразок протимікробних речовин для калібрування кривої, що входять до набору, негативний контроль - чисте молоко. Позитивний контроль - надається виробником або готується шляхом додавання в чисте молоко відповідної діючої речовини.

1	2	3	4	5
Тип тесту	Усі скринінгові тести на імунній або клітинній основі	Скринінгові тести, що базуються на принципі пригнічення росту мікроорганізмів	Швидкі тести з бічним потоком	Імуноферментний аналіз
Перешкоди, що призводять до хибнонегативних результатів	тест не дає правильного профілю селективності і чутливості	хибнопозитивний результат за рахунок кислого рН або кислого молока	склад молока впливає на швидкість потоку (наприклад, високий вміст ліпідів)	Втрати при пробопідготовці
Перешкоди, що призводять до хибнопозитивних результатів	перехресна контамінація під час пробопідготовки або інкубації. Складний склад молока (кількість соматичних клітин, вміст білка та жиру)	хибнопозитивний результат за рахунок наявності консервантів або інших інгібіторів, високого рН, вільних жирних кислот і токсинів <i>Pseudomonas</i>	перехресна реактивність з іншими групами антибіотиків	перехресна реактивність з антибіотиками з однієї або інших груп. Фоновий сигнал матриці на рівні близькому до LOD.
Валідаційні характеристики	виробник перевіряє тест на селективність, специфічність, здатність виявлення та точність і дані надаються кінцевому користувачу.	рекомендації референс лабораторії ЄС для валідації скринінгових методів 2010/01/20 [19]	рекомендації референс лабораторії ЄС для валідації скринінгових методів 2010/01/20 [19]	згідно з рішенням Комісії ЄС 2021/808/ЄС [17]

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. ДСТУ 8397:2015. Молоко і молочні продукти. Методи якісного визначання антибіотиків, сульфаніламідів та інших інгібіторів. [Чинний від 21.08.2015]. Вид. офіц. Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2015. 18 с.
2. ДСТУ 8378:2015. Молоко. Методи визначення соди. [Чинний від 21.08.2015]. Вид. офіц. Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2016. 12 с.
3. ДСТУ 7359:2013 Молоко. Метод визначення аміаку. [Чинний від 22.08.2013]. Вид. офіц. Київ: Мінекономрозвитку України, 2014. 8 с.
4. ДСТУ ISO 707:2002. Молоко та молочні продукти. Настанови з відбирання проб. (ISO 707:1997, IDT). [Чинний від 18.09.2002]. Вид. офіц. Київ: Держспоживстандарт України, 2004. 94 с.
5. ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019 Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (EN ISO/IEC 17025:2017, IDT; ISO/IEC 17025:2017, IDT). [Чинний від 23.12.2019]. Вид. офіц. Київ: Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2020. 24 с.
6. Закон України Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів від 23.12.1997р. - №771/97-ВР (редакція 26.10.2023р.) URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0716-22#Text>.
7. Закон України Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин // від 18.05.2017 р. №2042-VIII. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2042-19#Text>.
8. Закон України Про побічні продукти тваринного походження, не призначені для споживання людиною від 07.04.2015 №287-VIII. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/287-19#Text>.
9. Наказ Мінекономіки від 30.12.2021 №1177-21 Про затвердження деяких нормативно-правових актів щодо використання протимікробних ветеринарних лікарських засобів у ветеринарній медицині та звітування про обсяги їх застосування зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 13 січня 2022 року за №32/37368.
10. Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України від 11.07.2018 року №490 "Про затвердження Порядку відбору зразків та їх перевезення (пересилання) до уповноважених лабораторій для цілей державного контролю та Форми акта відбору зразків", зареєстрований в Міністерстві юстиції України від 26 грудня 2018 за №1464/32916.
11. Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України від 16.03.2018 №141 «Про затвердження Порядку надання статусу офіційного ветеринарного лікаря, уповноваженого ветеринара, працівника бійні,

- уповноваженого на виконання обов'язків помічника державного ветеринарного інспектора, та здійснення їх діяльності», зареєстрований в Міністерстві юстиції України від 27 березня 2018 за №368/31820.
12. Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України від 12.03.2019 №118 «Про затвердження Вимог до безпечності та якості молока і молочних продуктів» зареєстрований в Міністерстві юстиції України 07 червня 2019 р. за №593/33564.
 13. Наказ Міністерства охорони здоров'я від 23.12.2019 №2646 «Про затвердження показників безпечності харчових продуктів "Максимальні межі (рівні) залишків діючих речовин ветеринарних препаратів у харчових продуктах тваринного походження», зареєстрований в Міністерстві юстиції України 14 січня 2020 р. за № 42/34325.
 14. Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України від 07.04.2022 №209 «Про затвердження Гігієнічних вимог до дрібнотоварного виробництва та обігу молока», зареєстрований в Міністерстві юстиції України від 25 квітня 2022 за № 452/37788.
 15. Угода про асоціацію між Україною, з однієї сторони, та Європейським Союзом, Європейським співтовариством з атомної енергії і їхніми державами-членами, з іншої сторони: за станом на 25 жовтня 2022 / Верховна Рада України. (https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/984_011#Text).
 16. Codex Alimentarius Commission. 2003. CAC/ MISC 5-1993 Glossary of terms and definitions (veterinary drugs residues in foods). CAC, Rome. (http://www.codexalimentarius.org/download/standards/348/CXA_005e_u.pdf)
 17. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. ELI: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2021/808/oj.
 18. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (Text with EEA relevance). ELI: [http://data.europa.eu/eli/reg/2010/37\(1\)/oj](http://data.europa.eu/eli/reg/2010/37(1)/oj).
 19. Community Reference Laboratories. 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines, 20/1/2010. CRLs, European Commission, Brussels. ELI: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf.

20. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj>
21. ISO 18330/IDF188 Milk and milk products – guidelines for the standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues. Published (Edition 1, 2003).

КАМІНСЬКА Олена Василівна,
кандидатка сільськогосподарських наук,
головний фахівець з якості Державного науково-дослідного контрольного
інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок

ГАРКАВЕНКО Тетяна Олександрівна,
кандидатка ветеринарних наук, старша наукова співробітниця,
головна експертка швейцарсько-української програми “Розвиток торгівлі з
вищою доданою вартістю в органічному та молочному секторах України”

СТИБЕЛЬ Володимир Володимирович,
доктор ветеринарних наук, професор, директор Державного науково-
дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок

ЯНОВИЧ Дмитро Вадимович,
доктор сільськогосподарських наук, заступник директора з питань
наукового забезпечення системи якості випробувань Державного науково-
дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок

**ВИЯВЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ІНШИХ
ІНГІБІТОРІВ У СИРОМУ МОЛОЦІ:
ВИКОРИСТАННЯ СКРИНІНГОВИХ ТА ПІДТВЕРДЖУЮЧИХ МЕТОДІВ
У МЕЖАХ ПРОГРАМИ КОНТРОЛЮ СИРОГО МОЛОКА**
(Методичні рекомендації)

В авторській редакції
Підписано до друку _____ Формат _____
Папір друк. №2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. 1.6
Тираж _____ Зам. № _____

Видавець: _____
Тел.: _____
E-mail: _____



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

FiBL


SAFOSO

Швейцарська Конфедерація

Цю публікацію було створено за підтримки Швейцарії в межах швейцарсько-української програми «Розвиток торгівлі з вищою доданою вартістю в органічному та молочному секторах України», що впроваджується Дослідним інститутом органічного сільського господарства (FiBL, Швейцарія) у партнерстві із SAFOSO AG (Швейцарія). Відповідальність за зміст цієї публікації несе виключно автор(и). Точка зору автора(ів) не обов'язково відображає точку зору SECO, FiBL, SAFOSO AG, www.qftp.org