

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет ТВПШТСБ

Кафедра біотехнології та біоінженерії

Спеціальність 162 – «Біотехнології та біоінженерія»

Ступінь вищої освіти «Магістр»

Допустити до захисту

Рекомендувати до захисту

Декан _____ Михайло ГИЛЬ

В.о. зав. кафедри _____ Олена КАРАТЄЄВА

“ ____ ” _____ 2025р.

“ ____ ” _____ 2025р.

**КОМПЛЕКСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКУМУЛЬОВАНИХ
АНТИБІОТИКІВ МЕТОДОМ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО СКРИНІНГУ ІЗ
ПОДАЛЬШИМ ХРОМАТОГРАФІЧНИМ АНАЛІЗОМ
ХЛОРАМФЕНІКОЛУ**

04.02. – КР. 105-О. 25 07 22. 002

Виконавець:

здобувачка вищої

освіти II курсу _____ Анастасія БОДЮЛ

Науковий керівник:

доцентка _____ Олена КАРАТЄЄВА

Рецензент:

Завідувач лабораторії біотехнології

**мікробного синтезу Інституту мікробіології
та вірусології ім.**

Д.К. Заболотнього _____ Сергій СКРОЦЬКИЙ

Миколаїв 2025

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. ЗКА у харчовій продукції: виклики для біобезпеки, правове регулювання та моніторингові стратегії	9
1.2. Стійкість та біоаккумуляція антибіотиків у природних і виробничих екосистемах	12
1.3. Стан та особливості застосування методів детектування ЗКА у харчових матрицях в Україні	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ	23
2.1. Місце та об'єкт досліджень	23
2.2. Методика виконання роботи	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	35
3.1. Компаративний аналіз взаємодії тест-культур з еталонними антибіотиками	35
3.2. Розрахунок біоактивності антибіотиків методом визначення залишкових антибіотиків	38
3.3. Визначення рівня перехресної реактивності та ризику хибних результатів експрес-тестів	41
3.4. Дослідження кореляції результатів скринінгових методів та ВЕРХ у контролі залишкових кількостей антибіотиків	44
3.4.1. Оцінювання валідаційних параметрів ВЕРХ-УФ як референтного методу визначення хлорамфеніколу	44
3.4.2. Порівняльний аналіз результатів скринінгових і референтних методів визначення хлорамфеніколу в біологічних матрицях	50
3.5. Економічна частина	55

РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	60
РОЗДІЛ 5. БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ	64
РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	68
ВИСНОВКИ	71
ПРОПОЗИЦІЇ	73
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	74
ДОДАТОК А	80
ДОДАТОК Б	81
ДОДАТОК В	82
ДОДАТОК Д	83
ДОДАТОК Ж	84
ДОДАТОК З	85

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота на тему «Комплексне дослідження біоакумульованих антибіотиків методом мікробіологічного скринінгу із подальшим хроматографічним аналізом хлорамфеніколу» виконана на базі Миколаївської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в умовах сектору рідинної хроматографії хіміко-токсикологічного відділу.

Загальний обсяг роботи становить 87 сторінок друкованого тексту. Структура включає шість розділів, серед яких: аналітичний огляд наукових джерел; характеристика об'єкта та матеріалів дослідження; опис умов проведення експериментів і застосованої методики; представлення та інтерпретація отриманих результатів та економічна доцільність розробки; розділи, присвячені питанням охорони праці, техніці безпеки у надзвичайних ситуаціях та екологічним аспектам діяльності лабораторії. Робота ілюстрована 17 таблицями та 13 рисунками, що забезпечують наочність викладу матеріалу, а також містить 6 додатків, у яких наведено допоміжні матеріали, процедури та окремі етапи проведених досліджень.

Мета дослідження, поданого в кваліфікаційній роботі. З огляду на інтенсивне застосування антимікробних препаратів у тваринництві та харчовій промисловості та заборонений статус хлорамфеніколу з необхідністю контролю на рівні MRL, метою дослідження є впровадження надійного алгоритму лабораторного виявлення біоакумульованих антибіотиків у продуктах тваринного походження.

Дослідження охоплювало комплексне визначення залишкових кількостей антибіотиків у біологічних матрицях із застосуванням мікробіологічних, імуноферментних та хроматографічних підходів. Розроблений метод вискоєфективної рідинної хроматографії забезпечив високу аналітичну точність і достовірність визначення хлорамфеніколу, що дозволило ефективно підтвердити результати первинного скринінгу та підвищити надійність контролю ЗКА у продуктах тваринного походження.

Завдання дослідження безпосередньо включають:

1. Оцінити взаємозв'язок тест-культур із еталонними антибіотиками;
2. Визначити біологічну активність антибіотиків, виявлених методом мікробіологічного скринінгу;
3. Оцінити перехресну реактивність експрес-тестів та ймовірність хибно-позитивних або хибно-негативних результатів;
4. Виконати зіставлення результатів мікробіологічного та імунологічного скринінгу з методами ВЕРХ на реальних та «спайкованих» зразках з розрахунком діагностичних характеристик;
5. Надати економічний аналіз проведених досліджень.

Об'єктом дослідження є залишкові кількості біоакумульованих антибіотичних препаратів у продуктах тваринного походження.

Предметом дослідження є комплекс мікробіологічних і хроматографічних підходів, спрямованих на виявлення та підтвердження ЗКА, включаючи скринінгові методи із застосуванням тест-культур, експрес-тесту та верифікацію отриманих результатів методом ВЕРХ-УФ.

Ключові слова: тест-культури мікроорганізмів, біоаккумуляція, залишкові кількості антибіотиків, ВЕРХ-УФ, імунорецепція, пеніцилін, цинкбацитрацин, хлорамфенікол, стрептоміцин, період напіврозпаду.

Результати роботи апробовані на VIII International Scientific and Theoretical Conference Theoretical and practical scientific achievements: research and results of their implementation опубліковані в закордонному виданні **Бодюл А.С.** Effect of concentrations antibiotic standard on the inhibition zones of test cultures. Theoretical and practical scientific achievements: research and results of their implementation: collection of scientific papers «SCIENTIA» with Proceedings of the VIII International Scientific and Theoretical Conference, February 21, 2025. Liverpool, England, United Kingdom: International Center of Scientific Research: <https://doi.org/10.36074/scientia-21.02.2025> (додаток 3).

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ATCC – American Type Culture Collection

EFSA – European Food Safety Authority; Європейське агентство з безпеки харчових продуктів

FLD-детектор – флуориметричний детектор

GLP – Good Laboratory Practice; Належна лабораторна практика

LOD – Limit of Detection; мінімальна концентрація аналіту, що може бути достовірно визначена аналітичним методом.

MRL – Maximum Residue Limit; максимально допустимий рівень залишкового вмісту

NPV – Negative Predictive Value; негативна прогностична цінність

PPV – Positive Predictive Value; позитивна прогностична цінність

RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed; Європейська система швидкого оповіщення про харчові продукти і корми

UV-детектор – спектрофотометричний (ультрафіолетовий) детектор

БРТ-тест – Brilliant Black Reduction Test

ВЕРХ-МС/МС – вискоєфективна рідинна хроматографія з мас-спектрометрією

ВЕРХ-УФ – вискоєфективна рідинна хроматографія зі спектрофотометричним (ультрафіолетовим) детектором

ГДК – гранично допустима концентрація

ЗКА – залишкові кількості антибіотиків

КЕКВ – код економічної класифікації видатків бюджету

РХ-МС/МС – рідинна хроматографія з мас-спектрометрією

ТМБ – 3,3',5,5' тетраметилбензидин

ХАФ – хлорамфенікол

ВСТУП

Антибіотики являють собою біологічно активні речовини, що мають здатність знищувати або гальмувати розвиток різних мікроорганізмів, зокрема бактерій. Вони можуть утворюватися природним шляхом у процесі життєдіяльності певних мікроорганізмів, таких як гриби або бактерії, або бути синтезованими штучно в лабораторних умовах [3].

Антибіотичні препарати широко застосовуються у ветеринарній практиці як засоби лікування, профілактики та стимуляції росту у тваринництві. Проте порушення регламентованих умов застосування, зокрема ігнорування періоду каренції, призводить до накопичення залишкових кількостей антибіотиків у харчових продуктах тваринного походження – м'ясі, молоці, яйцях, рибі і т.д. [1, 2]. Ці речовини характеризуються хімічною стабільністю та здатністю до біоаккумуляції, що створює ризик хронічного впливу навіть при низьких концентраціях [3].

Одна з найбільш критичних загроз – формування антибіотикорезистентності. За даними ВООЗ, щороку понад 700 тис. людей у світі помирають від інфекцій, спричинених стійкими до антибіотиків бактеріями; до 2050 року ця цифра може сягнути 10 мільйонів [4]. Крім того, антибіотики можуть викликати алергічні реакції, порушення кишкової мікробіоти, імуносупресію, а також мутагенні й тератогенні ефекти [5].

З метою захисту здоров'я споживачів FDA заборонила використання таких лікарських засобів, як хлорамфенікол, фуразолідон, нітрофуразон, сульфаніламідни та фторхінолони у лактуючих тварин, якщо відповідна інформація не вказана на етикетці [6, 7].

У межах ЄС функціонує система раннього оповіщення RASFF, яка забезпечує оперативне виявлення та фіксацію випадків перевищення допустимих залишкових рівнів антибіотиків. У 2022 році зафіксовано понад 300 інцидентів, пов'язаних із виявленням антибіотиків у продуктах тваринного походження [6, 10]. За даними щорічних звітів системи RASFF, з

території України протягом останніх років неодноразово надходили нотифікації про виявлення ХАФ, що свідчить про наявність нелегального або неконтрольованого використання цього препарату в сільському господарстві [10].

Підсумовуючи, актуальність даного дослідження зумовлена широким використанням антибіотиків у тваринництві та харчовій промисловості, що супроводжується ризиком накопичення їх залишкових кількостей у продуктах тваринного походження та об'єктах довкілля. З огляду на це, особливу токсикологічну увагу привертає хлорамфенікол (ХАФ) – представник групи феніколів, який інгібує синтез білка у бактеріальних клітинах. На відміну від більшості інших антибіотиків, для яких визначаються допустимі рівні залишкових кількостей (MRL), хлорамфенікол, відповідно до вимог Codex Alimentarius та Регламенту (ЄС) № 37/2010, віднесений до сполук, для яких такий рівень не може бути встановлений [8].

Проблема додатково ускладнюється фармакокінетичними властивостями антибіотиків, серед яких повільний метаболізм, висока ліпофільність та схильність до накопичення у тканинах. Найбільш вразливими до біоаккумуляції залишкових кількостей є печінка, нирки, жирова та м'язова тканини, що створює ризик хронічного впливу на організм людини навіть при споживанні продуктів із мінімальним вмістом заборонених речовин. Саме тому контроль біоаккумуляованого ХАФ у харчових продуктах набуває виняткової актуальності та потребує застосування високочутливих і верифікованих методів аналітичного визначення [9].

З метою підвищення достовірності аналізу залишкових кількостей ХАФ, було розпочато апробацію та валідацію вискоєфективного рідинно-хроматографічного методу згідно з вимогами методичних вказівок МВ МРДЛДПСС 7.2-01-02-02-11 та міжнародного стандарту ISO 13493:2021 «Meat and meat products – Determination of chloramphenicol content – Reference method».

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. ЗКА у харчовій продукції: виклики для біобезпеки, правове регулювання та моніторингові стратегії

Використання антибіотиків у тваринництві та харчовій промисловості становить одну з найважливіших проблем сучасної біобезпеки. За оцінками, у 2020 році глобальне застосування антимікробних препаратів у тваринництві сягнуло понад 99 502 тон, що підтверджує високий рівень залежності харчового виробництва від антимікробних засобів [11]. Проте їх залишкові кількості у продуктах тваринного походження (м'ясі, молоці, яйцях) становлять серйозну загрозу для здоров'я людини. Вони можуть сприяти розвитку антибіотикорезистентності у патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, яка визнана Всесвітньою організацією охорони здоров'я одним із головних глобальних викликів XXI століття [12].

Антибіотикорезистентність є багатофакторним феноменом, що значно ускладнюється поширенням мультирезистентних бактеріальних штамів, здатних витримувати дію декількох класів протимікробних препаратів одночасно. Ключовим механізмом цього процесу виступає горизонтальний перенос генів резистентності, який реалізується через такі молекулярні механізми, як кон'югація, трансформація та трансдукція. Це сприяє швидкій дисемінації генетичних детермінант стійкості не лише серед патогенних, але й серед умовно-патогенних та сапрофітних мікроорганізмів, що формує так званий «резистом» у мікробних екосистемах [13].

Подібні процеси істотно підривають ефективність традиційної антимікробної терапії та створюють довгострокові ризики для системи охорони здоров'я і безпеки харчового ланцюга. З огляду на це, міжнародні регуляторні органи наголошують на необхідності жорсткого контролю залишкових кількостей антибіотиків на всіх етапах виробництва харчових

продуктів – від первинного тваринництва до кінцевої реалізації готової продукції [13].

Особливої уваги заслуговують сполуки, що мають високий токсикологічний потенціал навіть у слідових концентраціях. До них належить хлорамфенікол (ХАФ) – антибіотик широкого спектра дії, використання якого у тваринництві заборонено у більшості країн світу. Це обумовлено його доведеною токсичністю, включно з ризиком розвитку апластичної анемії, а також ймовірними канцерогенними та мутагенними властивостями. Дані фактори стали підґрунтям для встановлення суворой заборони на застосування ХАФ у продуктивних тварин та зумовили необхідність його обов'язкового лабораторного контролю навіть на рівні мінімально можливих залишкових концентрацій [13].

На міжнародному рівні система регулювання залишкових кількостей антибіотиків у продуктах харчування тваринного походження ґрунтується на комплексі нормативних документів, серед яких ключове значення має Регламент (ЄС) № 37/2010 та положення Codex Alimentarius. Для ХАФ у цих документах передбачено принцип «нульової толерантності» – не визначено допустимих рівнів залишків, а єдиним критерієм контролю є факт аналітичного виявлення речовини. У цьому контексті застосовується поняття мінімального рівня продуктивності методу (MRL), який визначає чутливість аналітичного методу, а не токсикологічно обґрунтовану норму. Відповідно до ISO 23970:2021, для високочутливих методів хромато-мас-спектрометричного аналізу (PX-MC/MC) MRL для ХАФ встановлений на рівні 0,3 мкг/кг [14].

У практиці аналітичного контролю залишків антибіотиків важливо чітко розмежовувати два поняття: гранично допустима концентрація (ГДК) та MRL. ГДК визначає максимальний рівень речовини, що може залишатися у продуктах без ризику для здоров'я людини, тоді як MRL є виключно аналітичною характеристикою чутливості методу, яка забезпечує виявлення заборонених сполук навіть у слідових концентраціях. Наприклад, у ряді країн

національні нормативні акти передбачають умовне значення ГДК для ХАФ на рівні 0,01 мг/кг (10 мкг/кг), тоді як європейське законодавство орієнтується на MRL у 0,3 мкг/кг, що на порядок нижче та демонструє жорсткіший підхід до моніторингу [11].

Важливо підкреслити, що MRL не слід трактувати як допустимий рівень залишків: його перевищення свідчить про підтверджену наявність забороненої речовини та розглядається як небезпека фальсифікації харчових продуктів, які підлягають вилученню з обігу. Таким чином, у науковій інтерпретації результатів аналізу залишків ХАФ саме MRL доцільно використовувати як методологічний орієнтир відповідності продукції вимогам безпеки [14].

Попри міжнародну заборону, в Україні спостерігається тривожна тенденція періодичного виявлення ХАФ у харчових продуктах, зокрема в меді, м'ясі птиці, молоці та рибі. Згідно з даними щорічних звітів системи RASFF, протягом останніх років із території України надходили численні нотифікації щодо виявлення хлорамфеніколу, що свідчить про наявність нелегального використання цього препарату у виробничій практиці [12].

Причини збереження такої негативної динаміки можуть мати комплексний характер: застосування контрафактних чи незареєстрованих ветеринарних препаратів, недостатній контроль на рівні малих господарств, а також технічне відставання окремих лабораторій у забезпеченні сучасного інструментального моніторингу. Крім того, використання ХАФ у бджільництві для лікування бактеріальних хвороб (зокрема європейського та американського гнильців) залишається ймовірною практикою, хоча й прямо забороненою чинним законодавством [13].

За даними дослідження, опублікованого у «Наукових працях НУХТ» (2022), під час аналізу 300 зразків натурального меду, призначеного для подальшої переробки у харчовій промисловості, було встановлено наявність залишкових кількостей різних антибіотиків. Зокрема, виявлено синтоміцин (до 2,03 мкг/кг), метронідазол (до 45,7 мкг/кг), сульфаніламідні препарати, а

також хлорамфенікол у межах до 1,3 мкг/кг. Попри те, що у 82,3 % проб залишкові кількості антибіотиків не фіксувалися, виявлення заборонених речовин у частині зразків свідчить про збереження проблеми застосування недозволених ветеринарних препаратів у бджільництві. Такі результати підкреслюють необхідність системного посилення державного лабораторного контролю за якістю меду, впровадження сучасних аналітичних методів та узгодження національних вимог із міжнародними регламентами у сфері харчової безпеки [22].

Моніторингові стратегії в країнах ЄС та на міжнародному рівні базуються на поєднанні планових перевірок, наукового аналізу ризиків і впровадженні новітніх високоефективних методів хімічного контролю. Згідно з останніми звітами EFSA, залишкові кількості антимікробних засобів у продуктах харчування здебільшого не перевищують допустимі межі, однак окремі випадки виявлення заборонених препаратів, зокрема ХАФ, продовжують становити серйозну проблему для міжнародної торгівлі та харчової безпеки [15].

1.2. Стійкість та біоаккумуляція антибіотиків у природних і виробничих екосистемах

Стійкість та біоаккумуляція антибіотиків у природних і виробничих екосистемах є надзвичайно актуальною проблемою сучасної науки та практики безпечності харчових продуктів. Використання антибактеріальних препаратів у ветеринарії та тваринництві значно підвищило ефективність лікування та профілактики інфекційних захворювань, проте водночас зумовило зростання ризику їх залишкової присутності у продуктах харчування тваринного походження. Антибіотики здатні накопичуватися у тканинах та біологічних рідинах сільськогосподарських тварин, птиці та риби, утворюючи певні депо, що ускладнює їх виведення і створює передумови до довготривалої біоаккумуляції. Крім того, багато з них

характеризуються високою стабільністю та здатністю зберігати біологічну активність після технологічної чи кулінарної обробки, що посилює потенційні ризики для здоров'я споживачів [16].

Біоаккумуляція антибіотиків у живих організмах є наслідком поєднання фізико-хімічних властивостей сполук (ліпофільність, стійкість до метаболізму, спорідненість до білків плазми) та біологічних особливостей організмів-накопичувачів. Найчастіше антибіотики депонуються у печінці, нирках, м'язовій тканині та жирових відкладеннях, а у випадку риби та морепродуктів – також у зябрах і кишечнику. Особливо стійкими до деградації виявляються сполуки, що здатні формувати стабільні комплекси з білками чи тканинними структурами [17].

Серед основних груп антибіотиків, що широко застосовуються у ветеринарній практиці та харчовій промисловості, слід виділити пеніциліни, аміноглікозиди (зокрема стрептоміцин), поліпропептидні сполуки (цинкбацитрацин), а також феніколи, з яких особливу увагу привертає хлорамфенікол. Кожна з цих груп відрізняється специфічними механізмами дії, фармакокінетикою та потенціалом біоаккумуляції (табл. 1) [18].

Пеніцилінова група характеризується відносно швидким виведенням з організму, однак їх залишки регулярно виявляються у молоці та м'ясі, що пояснюється як порушенням термінів каренції, так і застосуванням підвищених терапевтичних доз. Препарати є термолабільними, проте навіть після пастеризації чи кулінарної обробки можуть залишатися імунореактивні фрагменти, що здатні спричиняти алергічні реакції у людини [19].

Стрептоміцин та інші аміноглікозиди відзначаються високою спорідненістю до тканин нирок і печінки, де вони можуть зберігатися тривалий час. Їхня термічна стабільність вища, ніж у пеніцилінів, тому залишкові кількості стійкі до кулінарної обробки. При систематичному надходженні в організм людини навіть невеликі концентрації аміноглікозидів можуть призводити до порушення функцій нирок і слухового апарату [19].

Таблиця 1

**Термічна стабільність і продукти розпаду досліджуваних груп
антибіотиків**

Антибіотична група	Температура та періоди напіврозпаду ($t_{1/2}$)	Продукти розпаду
Аміноглікозиди [23]	121 °C, 15 хв – більшість представників класифікують як термостійкі; при підвищенні температури > 70 °C у водних середовищах прискорюється хімічна деструкція.	Розрив глікозидних зв'язків з утворенням стрептидину та стрептобіозаміну; для інших аміноглікозидів – деглікозилювання з утворенням відповідних аміносахарів.
Пеніциліни [24]	Водні розчини, pH≈7: $t_{1/2} \approx 36$ год при 30 °C, 22 год при 35 °C, 14 год при 40 °C, ~5 год при 50–51 °C (кінетика першого порядку). За 121 °C, 15 хв – група відноситься до термолабільних.	Гідролітична деструкція β -лактамів з утворенням пеніциллової кислоти (penicilloic acid), із подальшими перетвореннями до penillic/penilloic acids.
Бацитрацини [25]	До 85 °C: зменшення активності ~80 % за 1 год; $t_{1/2}$ при pH >7 – 0,4 h (~24 хв)	Окиснені форми (H1, H2, H3, F), продукти дезамінування, циклічні пептидні фрагменти
Феніколи [26]	55 °C – зберігає стабільність ≥ 60 діб у водних аптечних розчинах; 100 °C (харчові/водні матриці) – суттєвої деградації за короткі експозиції, як правило, не фіксують; 121 °C, 15 хв (автоклав) – належить до «термостійких» (мікробіологічна активність зберігається).	Гідроліз із утворенням 1-(p-нітрофеніл)-2-амінопропан-1,3-діолу (AMPD) та дихлороцтової кислоти; за окисно-фотолізних умов можливі p-нітробензальдегід та/або p-нітрофенол як вторинні продукти.

Примітка: числові значення $t_{1/2}$ для пеніцилінів розраховані з опублікованих констант швидкості ($t_{1/2} = \ln 2/k$). Для феніколів та аміноглікозидів наведено температурні інтервали та класи стабільності, підтверджені експериментальними дослідженнями; конкретні $t_{1/2}$ суттєво залежать від матриці, pH та іонної сили.

Особливе місце серед антибіотиків займає група феніколів, зокрема хлорамфенікол. Хлорамфенікол здатний інгібувати синтез білка у клітинах

кісткового мозку, що може спричиняти апластичну анемію, а також має канцерогенний і мутагенний потенціал. Його біоаккумуляційні властивості проявляються у депонуванні в печінці, нирках і м'язах, а термічна обробка не гарантує повного руйнування молекули. Виявлення навіть слідових концентрацій хлорамфеніколу у меді, молоці, м'ясі птиці чи рибі розцінюється як грубе порушення норм харчової безпеки [12, 20].

Відповідно до даних представлених в таблиці 1, проблема стійкості та біоаккумуляції антибіотиків у харчових продуктах є багатогранною та вимагає системного підходу до контролю. Вона охоплює не лише фармакологічні особливості окремих груп препаратів, але й технологічні аспекти їх виведення, здатність зберігатися після обробки, а також ризики для здоров'я споживачів. Моніторинг залишкових кількостей антибіотиків у молоці, м'ясі, рибі та яйцях залишається ключовим інструментом для забезпечення харчової безпеки та зниження загроз, пов'язаних із неконтрольованим використанням цих препаратів у сільському господарстві [21].

1.3. Стан та особливості застосування методів детектування ЗКА у харчових матрицях в Україні

Сучасні підходи до визначення залишкових кількостей біоаккумулявантх антибіотиків у харчових продуктах базуються на поєднанні скринінгових і підтверджувальних методів, що дозволяє досягти як високої чутливості, так і достовірності результатів. У світовій та європейській практиці використовується багаторівнева система контролю, де на першому етапі проводиться швидкий масовий скринінг, а на другому – підтверджувальний кількісний аналіз із застосуванням високочутливих інструментальних технологій [15, 22].

Методи мікробіологічного скринінгу, що базуються на принципі інгібування росту мікроорганізмів, поділяються на дві основні категорії: методи чашок Петрі та методи пробірок. Обидва підходи спрямовані на

виявлення залишкових концентрацій антибіотиків у досліджуваних зразках, проте вони мають суттєві відмінності у своїй реалізації, принципах роботи, чутливості та можливості класифікації антибіотиків [30, 34].

Мікробіологічні тести, зокрема Premi®Test, Delvotest і BIOEASY®, широко застосовуються як інструмент первинного скринінгу залишкових кількостей антибіотиків у продуктах тваринного походження. Їхня дія базується на здатності залишків антимікробних речовин інгібувати ріст чутливих тест-культур, найчастіше – *Bacillus stearothermophilus* [27].

Метод є неспецифічним, але ефективним для швидкого та масового контролю, особливо у програмах національного моніторингу. Водночас такі тести мають обмежену чутливість, не дозволяють ідентифікувати конкретну речовину та схильні до матричних ефектів [27, 28]. В таблиці 2 наведено стислу характеристику найпоширеніших комерційних тест-систем:

Таблиця 2

Характеристика мікробіологічних тест-систем

Назва тесту	Принцип дії	Досліджувані матриці	Особливості тест-системи
Premi®Test	Інгібування <i>B. stearothermophilus</i> + індикатор	Молоко, м'ясо, мед, яйця	Напівкількісний результат; чутливий до β-лактамів
Delvotest	Ріст <i>B. stearothermophilus</i> + рН-індикатор	Переважно молоко	Стандарт у молочній галузі; підвищена чутливість до пеніциліну G
BIOEASY®	Бактеріальний або імуноферментний принцип	Різноманітні матриці	Швидкі тести, включно з експрес-версіями; візуальне зчитування
РІДАСКРІН®	Імуноферментний аналіз (ІФА)	Молоко, м'ясо, корми, інші продукти	Висока специфічність і чутливість; застосування як скринінг та підтвердження
CHARM® ROSA	Імунологічний експрес-тест (Rapid One Step Assay)	Молоко, харчові продукти	Швидке виявлення антибіотиків; простота виконання, можливе використання у польових умовах

Попри зручність і доступність, мікробіологічні тести мають низку обмежень щодо контролю хлорамфеніколу (ХАФ): зокрема, тест-культури, як-от *Bacillus stearothermophilus*, відзначаються низькою чутливістю до феніколів, що може зумовлювати хибнонегативні результати [27], тоді як наявність природних інгібіторів у харчових матрицях часто спричиняє хибнопозитивні реакції [28]; до того ж, ці методи не забезпечують ідентифікацію діючої речовини і не дозволяють надійно виявляти ХАФ у слідових концентраціях [29].

Метод визначення залишкових кількостей антибіотиків із використанням чашок Петрі належить до класичних мікробіологічних скринінгових підходів, заснованих на принципі дифузії антимікробних речовин у тверде поживне середовище та пригніченні росту чутливих тест-мікроорганізмів [32].

Для проведення аналізу застосовують агаризовані поживні середовища, інокульовані стандартними тест-культурами бактерій, які мають високу чутливість до антибіотиків широкого спектра дії. Досліджувані зразки наносять на поверхню агару, після чого здійснюється інкубація за контрольованих параметрів температури та вологості (зазвичай протягом 18–24 год). У випадку наявності в зразку залишкових кількостей антибіотика, що перевищують пороговий рівень чутливості тест-системи, спостерігається утворення зони затримки росту навколо місця контакту. Якщо ж концентрація антимікробних речовин є недостатньою для інгібування мікроорганізмів, інгібіторна зона не формується [30, 33].

Особливістю методу є його універсальність: він дозволяє проводити як якісну оцінку наявності антимікробних залишків, так і напівкількісний аналіз за діаметром зони інгібування. Додатково, шляхом використання декількох поживних середовищ з варійованими показниками рН або з різними тест-бактеріями, можлива попередня ідентифікація та класифікація антибіотиків. Такий підхід ґрунтується на тому, що окремі групи препаратів виявляють специфічну активність лише за певних фізіолого-біохімічних умов росту

мікроорганізмів. Крім того, застосування хімічних модифікаторів, здатних блокувати або підсилювати дію окремих класів антимікробних речовин, дозволяє більш чітко визначити їхню належність до конкретного фармакологічного класу [31].

Міжнародний досвід скринінгових методів свідчить, що мікробіологічний скринінг широко застосовується для первинного моніторингу молока та продуктів тваринництва, особливо у країнах ЄС. Зокрема, у Ломбардії (Італія) при дослідженні сирого молока використання Delvotest® SP NT дало можливість ефективно виявляти β -лактамні антибіотики, тоді як остаточну ідентифікацію та кількісну оцінку здійснювали методом ВЕРХ у поєднанні з високороздільною мас-спектрометрією. Такий багаторівневий підхід дозволив не лише виявити потенційно небезпечні партії продукції, але й підтвердити специфічні антибіотичні сполуки з високою точністю, що відповідає сучасним регуляторним вимогам ЄС [35].

У вітчизняній практиці мікробіологічні скринінгові тести активно використовуються в системі державного моніторингу безпечності молока, меду та продуктів птахівництва. Масові дослідження у 2020–2024 рр. виявили окремі позитивні зразки молочної продукції із залишками біоакумульованих антибіотиків, що підтверджує ефективність скринінгових методів для раннього виявлення небезпечних випадків [36].

В Україні розроблені стандартизовані алгоритми, що поєднують мікробіологічний скринінг з експрес-тестами та імуноферментним аналізом, що дозволяє оптимізувати процедури підтвердження сумнівних результатів і скоротити витрати ресурсів. У дослідженнях щодо продукції птахівництва продемонстровано, що чутливість скринінгових підходів повністю корелює з результатами підтверджувальних інструментальних методів, зокрема ВЕРХ-МС/МС [36].

Високоєфективна рідинна хроматографія із застосуванням мас-спектрометричного детектування є сучасним стандартом підтвердження

результатів мікробіологічного скринінгу. Метод забезпечує кількісне визначення залишкових концентрацій широкого спектра антибіотиків у складних матрицях, що особливо важливо при низьких рівнях контамінації, недоступних для чутливості мікробіологічних підходів [37].

Проте, зважаючи на рівень технічного забезпечення більшості національних служб з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів, у практиці часто використовується альтернативний, більш доступний метод високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням. На відміну від ВЕРХ-МС/МС, цей метод характеризується відносною простотою, нижчими експлуатаційними витратами та менш жорсткими вимогами до калібрувальних процедур [38].

Ключовим етапом аналітичного процесу є пробопідготовка, яка істотно впливає на точність і відтворюваність результатів. Найпоширеніші протоколи екстракції ХАФ базуються на застосуванні ацетонітрилу або етилового ацетату, з наступною очисткою екстрактів за допомогою SPE-картриджів типу QuEChERS або Strata, що дозволяє знизити матричний ефект і підвищити чутливість методу [29].

Хоча чутливість та селективність ВЕРХ-УФ поступається мас-спектрометричним методам, цей метод дозволяє надійно контролювати рівні залишків найбільш поширених груп антибіотиків, зокрема тетрациклінів, фторхінолонів, феніколів, аміноглікозидів та β -лактамів, у продукції тваринництва. У поєднанні з попереднім мікробіологічним скринінгом застосування ВЕРХ-УФ є економічно обґрунтованим рішенням для лабораторій державного рівня з базовим технічним оснащенням, що забезпечує баланс між науковою достовірністю, практичною доступністю та вимогами регуляторних органів [38].

Найбільш уживаним підходом до виявлення залишкових кількостей антибіотиків, що можуть персистувати у продуктах тваринного походження, у мережі національних лабораторій є імуноферментний аналіз. Метод ґрунтується на специфічній взаємодії «антиген–антитіло» й у разі

низькомолекулярних сполук (антибіотики-гаптени) реалізується переважно у конкурентному форматі: зразкова молекула з матриці конкурує із міченим кон'югатом за зв'язування зі специфічним антитілом. Сигнал ферментної мітки перетворюється на оптичну густину після додавання хромогену й вимірюється спектрофотометрично (типово при ~ 450 нм). Кількісна оцінка ґрунтується на калібрувальній кривій (4- або 5-параметричний логістичний фіт), що забезпечує відтворюваний перехід «сигнал–концентрація» в діапазоні слідових рівнів [39].

Ключові переваги ІФА становлять: висока аналітична чутливість (LOD на рівні нг/г для типових матриць), відносна простота пробопідготовки, висока продуктивність (96-луночкові планшети, паралельна обробка багатьох зразків) і помірна собівартість. Це робить ІФА оптимальним для скринінгу молока, м'яса, риби, яєць, меду та комбікормів, коли необхідно швидко відсіяти підозрілі проби з мінімальними часовими витратами. Аналітична цінність ІФА підтверджується його відповідністю гігієнічним нормативам, наприклад, метод дозволяє контролювати ГДК на рівні 750 нг/кг (ХАФ), забезпечуючи оперативне виявлення перевищень на етапі первинного скринінгу [40].

У випадку визначення бензилпеніциліну методика базується на використанні планшетів, попередньо сенсibilізованих з'єднувальним антигеном. Бензилпеніцилін, присутній у досліджуваному зразку, конкурує зі зв'язаним антигеном за специфічні антитіла. Після інкубації додається кон'югат ферменту та субстрат ТМБ, що забезпечує розвиток кольорової реакції. Інтенсивність оптичної щільності зразка вимірюється на спектрофотометрі та має обернену кореляцію з концентрацією бензилпеніциліну. Кількісна оцінка здійснюється шляхом порівняння результатів зі стандартною калібрувальною кривою, що гарантує точність та відтворюваність визначення навіть при низьких концентраціях ЗКА [43].

Аналогічний підхід застосовується для визначення стрептоміцину, що належить до аміноглікозидних антибіотиків. Принцип конкурентного ІФА

передбачає змагання молекул стрептоміцину з антигеном, нанесеним на тверду фазу, за зв'язування з антитілами. Подальше додавання ферментного кон'югату і субстрату ТМБ призводить до утворення забарвлених продуктів реакції, інтенсивність яких фіксується фотометрично. Як і у випадку з пеніциліном, оптична щільність сигналу є обернено пропорційною до вмісту стрептоміцину в аналізованій пробі, що дозволяє отримати кількісні результати завдяки побудованій калібрувальній кривій [44].

Особливої уваги заслуговує методика визначення хлорамфеніколу, що має суворі обмеження у використанні через потенційні токсикологічні ризики. Планшети, сенсibilізовані антитілами до хлорамфеніколу, дозволяють проводити конкурентний ІФА з високим рівнем селективності. Під час інкубації відбувається конкуренція між вільними молекулами антибіотика у пробі та кон'югатом хлорамфеніколу з ферментом за специфічні антитіла. На етапі промивання видаляються незв'язані молекули, після чого додається субстратно-хромогенний розчин. Внаслідок ферментативної реакції безбарвний хромоген набуває блакитного забарвлення, що згодом змінюється на жовтий після внесення стоп-реагенту. Оптична щільність, вимірювана при довжині хвилі 450 нм, обернено пропорційна кількості хлорамфеніколу в зразку. Така схема забезпечує можливість точного кількісного визначення антибіотика навіть у складних харчових матрицях (молоко, м'ясо, яйця, мед), що робить її надзвичайно актуальною для контролю якості харчових продуктів [45].

Водночас методи ІФА мають притаманні імунодіагностиці обмеження. Специфічність може знижуватися через перехресні реакції зі структурно спорідненими сполуками, що підвищує ризик хибнопозитивних результатів, особливо поблизу регуляторних порогів. Ефекти матриць, зумовлені присутністю жирів, білків, цукрів і пігментів, можуть впливати на зв'язування або пригнічувати ферментативні реакції, що призводить до похибок у результатах. Для їх мінімізації використовують комплекс заходів: екстракцію та очищення проб, розведення, калібрування із врахуванням

матричних ефектів, а також контрольні та спайк-зразки для оцінки точності та відновлення методу. Валідація і рутинний контроль якості охоплюють показники точності (повернення), прецизійності (RSD_r , RSD_R), межі виявлення/кількісного визначення, правильності та розширеної невизначеності; результати відстежують за контрольними картами, періодично підтверджують міжлабораторними випробуваннями [41].

З урахуванням зазначених характеристик, ІФА розглядається як ключовий етап скринінгу у багаторівневій системі моніторингу залишкових кількостей антибіотиків. Позитивні або сумнівні результати цього аналізу підлягають підтвердженню за допомогою інструментальних методів, головним чином ВЕРХ-МС/МС, ВЕРХ-УФ чи інших хромато-мас-спектрометричних підходів, які відзначаються високою селективністю, аналітичною точністю та здатністю визначати концентрації, що відповідають міжнародним та національним нормативним вимогам. Синергія скринінгового етапу і підтверджувального етапу сприяє раціоналізації витрат, підвищує ефективність обробки великого масиву зразків і водночас гарантує доказову силу висновків державного контролю [42].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ

2.1. Місце та об'єкт досліджень

Миколаївська регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби є профільною установою ветеринарно-санітарної експертизи та контролю безпеки харчових продуктів, що функціонує у складі Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів. Лабораторія має розгалужену організаційну структуру, яка забезпечує ефективне виконання завдань у сфері ветеринарної медицини, санітарного контролю та екологічного моніторингу. Установа акредитована Національним агентством з акредитації України згідно з вимогами ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019, що підтверджує її технічну компетентність у сфері захисту прав споживачів та безпечності харчових продуктів [46].

Технологічна структура діяльності лабораторної установи охоплює всі етапи – від приймання та реєстрації зразків до обробки та інтерпретації результатів і формування експертного висновку. Організація роботи лабораторії відповідає принципам GLP, вимогам біобезпеки та належної лабораторної практики. Для забезпечення стабільності результатів застосовуються системи внутрішнього контролю якості, з використанням сертифікованих стандартів і валідацією методик згідно з міжнародними вимогами ISO 17025 [46].

У ході проведення досліджень використовувалися матеріали експертиз хіміко-токсикологічного відділу, секторів рідинної хроматографії та мікробіологічної експертизи Держпродспоживслужби м. Миколаїв. Функціонування секторів спрямоване на вирішення завдань державного моніторингу безпечності харчових продуктів і захисту споживачів, зокрема на своєчасне виявлення залишкових кількостей заборонених або обмежених у застосуванні препаратів. Поєднання скринінгових методів первинної

детекції з підтверджувальними методами ВЕРХ з УФ-детекцією забезпечує високу чутливість і селективність аналізу, що дозволяє надійно ідентифікувати антибіотики та інші токсикологічно значущі речовини навіть у слідових концентраціях [46].

Матеріально-технічна база секторів укомплектована перевіреним та рекомендованим метрологічними службами аналітичним обладнанням, що за характеристикою відповідні до чинних в нормативній документації. Оскільки розробка методу передбачає вдосконалення сектору РХ, то варто зазначити, що сектор обладнаний наступними хроматографічними системами: однокомпонентна SS UV 1000 із спектрофотометричним детектором, який характеризується високою стабільністю сигналу та точністю кількісного аналізу; однокомпонентна «СТАЙЕР» з флуориметричним детектором, спеціалізований для визначення сполук, що мають властивість флуоресценції; а також багатоконпонентна система UltiMate 3000, оснащена UV- та FLD-детекторами, що дозволяє одночасно проводити багатопараметричний аналіз із поєднанням високої чутливості та селективності.

Поєднання UV- та FLD-детекції значно підвищує достовірність результатів: подвійна система сигналів мінімізує ймовірність хибнопозитивних знахідок, дозволяє підтверджувати ідентифікацію аналітів за спектральними характеристиками та визначати їх кількісний вміст на рівнях, наближених до межі чутливості.

2.2. Методика виконання роботи

У ході дослідження було використано матеріали експертиз, отриманих у хіміко-токсикологічному відділі Держпродспоживслужби м. Миколаєва. Випробувальна лабораторія, акредитована НААУ відповідно до вимог стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 [46].

Методика дослідження передбачала мікробіологічний скринінг із

використанням тест-культур відповідно до *Методичних рекомендацій щодо визначення залишкової кількості антибіотиків у продукції тваринного походження мікробіологічним методом* та тест-систем для імуно-рецепторного аналізу згідно з *Методичними рекомендаціями з визначення хлорамфеніколу в зразках збірного молока за допомогою тест-систем для імуно-рецепторного аналізу*. Для підтвердження та кількісного визначення хлорамфеніколу застосовано ВЕРХ-УФ метод відповідно до Методичних вказівок МВ МРДЛДПСС 7.2-01-02-02-11 та міжнародного стандарту ISO 13493:2021 «Meat and meat products – Determination of chloramphenicol content – Reference method».

Основною метою роботи було здійснення комплексного аналізу залишкових кількостей біоакумульованих антибіотиків із використанням мікробіологічного скринінгу та ВЕРХ-УФ, а також розроблення й апробація методики кількісного визначення хлорамфеніколу у харчових матрицях. Для її досягнення передбачалося: встановити взаємозв'язок між тест-культурами та еталонними антибіотиками, визначити їхню біологічну активність, оцінити специфічність експрес-тестів і ризик похибок, верифікувати метод ВЕРХ-УФ з урахуванням метрологічних характеристик, а також провести порівняльний аналіз результатів обох підходів на реальних і модельних зразках.

У межах дослідження першим етапом застосовувався метод мікробіологічного скринінгу (додаток А), що ґрунтується на використанні тест-культур мікроорганізмів, чутливих до антибіотиків. Вибір тест-культур був зумовлений їхньою специфічною реакцією на антибіотики, що дозволяє якісно та кількісно оцінювати ЗКА у досліджуваних зразках.

Для реалізації дослідження було використано тест-культури мікроорганізмів, специфічно чутливих до різних груп антибіотиків: *Bacillus mycoides* ATCC 537 – індикатор стрептоміцинової групи, *Micrococcus flavus* ATCC 10240 – референтний штам для визначення дії цинкбацитрацину, та *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 – модельний мікроорганізм для аналізу пеніцилінів (рис. 1).

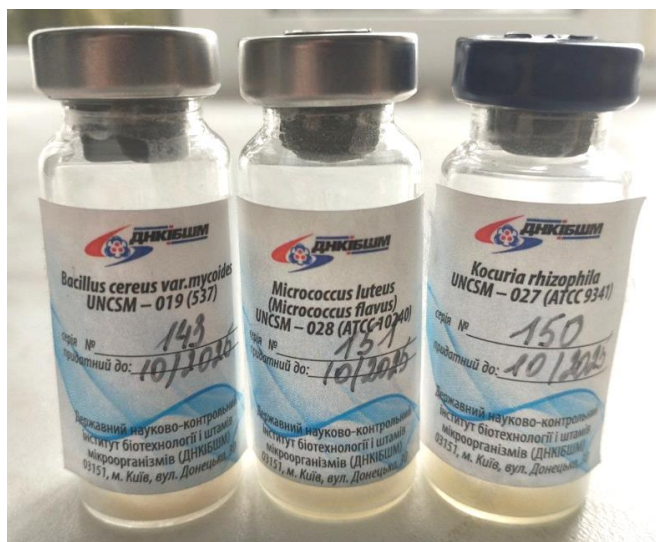


Рис. 1. Ліофілізати тест-культур *B. mycoides* ATCC 537, *M. flavus* ATCC 10240, *K. rhizophila* ATCC 9341

Для визначення чутливості тест-культур до антибіотиків використовували еталонні стандарти високої чистоти: Bacitracin Zinc (90,7%) – для *M. flavus* ATCC 10240, Streptomycin Sesquisulfate Hydrate (96,3%) – для *B. mycoides* ATCC 537 та Penicillin G Potassium Salt (98,41%) – для *K. rhizophila* ATCC 9341. Робочі розчини готували у стерильних умовах із застосуванням відповідних буферів (табл. 3).

Таблиця 3

Розведення еталонних антибіотиків для дослідження впливу різних концентрацій на зони інгібування росту тест-культур

Назва антибіотика	Номер розведення	Кількість розведеного антибіотика	Кількість, № буфера	Отримана концентрація, мкг/см ³
Streptomycin Sesquisulfate Hydrate	2	0,1 см ³ розв. 1	9,9 см ³ №6	10
	3	2 см ³ розв. 2	8 см ³ №6	2
Penicillin G Potassium Salt	2	0,1 см ³ розв. 1	9,9 см ³ №4	10
	4	5 см ³ розв. 3	5 см ³ №4	0,05
Bacitracin Zinc	3	2 см ³ розв. 2	8 см ³ №2	2
	4	1 см ³ розв. 3	9 см ³ №2	0,2

Для проведення скринінгу поживні середовища інокулювали суспензіями тест-культур (2,0; 3,0 та 1,0 см³ відповідно). Посів здійснювали у

відповідні агаризовані поживні середовища з регулюванням концентрації бактеріальних суспензій до мутності 1,7 од. МФ. Зокрема, середовище №4 використовували для виявлення стрептоміцинової групи з внесенням 2,0 см³ інокуляту, середовище №7 – для аналізу пеніцилінів із додаванням 3,0 см³ інокуляту, а середовище №6 – для оцінки дії цинкбацитрацину з об'ємом інокуляту 1,0 см³.

Після застигання агару стерильним скальпелем формували шість лунок (діаметром 9 мм): три для еталонного стандарту антибіотика, інші три – для розведеної дослідної проби. Стандарти та досліджувані проби вносилися за допомогою мікродозатора, відкаліброваного на об'єм 0,05 см³ (рис. 2).

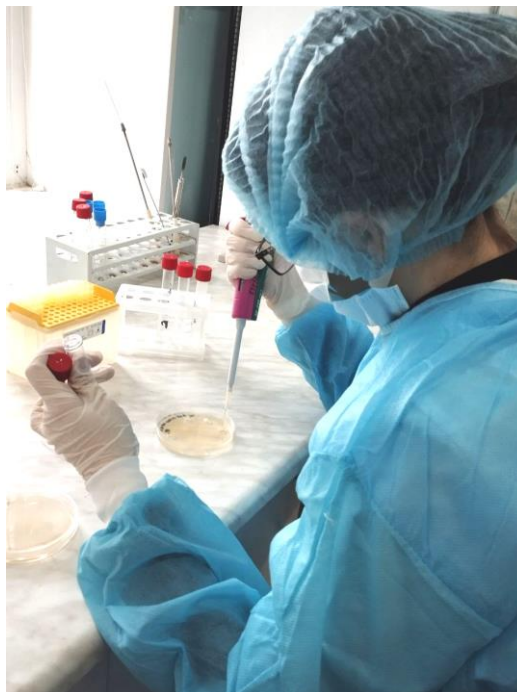


Рис. 2. Внесення стандарту антибіотика Streptomycin Sesquisulfate Hydrate VETRANAL (96,3%) у дослідні чашки Петрі

Оцінка та інтерпретація отриманих результатів здійснювалася шляхом вимірювання зон інгібування росту тест-культур із використанням високоточних вимірювальних інструментів. На основі отриманих даних розрахунок активності антибіотика здійснюється шляхом множення отриманого середнього значення (в мкг/см³) на відповідний коефіцієнт, розведений для конкретного типу продукту:

$$C=C \times K \quad (1)$$

де:

C – кінцева концентрація антибіотика (ОД/г або ОД/см³),

C – середнє значення активності (мкг/см³),

K – коефіцієнт стандартного розведення для кожного антибіотика.

Коефіцієнти розведення зразків встановлювали залежно від категорії продукції: для молока, молочних виробів, яєць та яєчних продуктів застосовували розведення 1:2 на першому етапі та 1:4 – на другому; для м'яса, м'ясних виробів та продукції аквакультури – відповідно 1:3 та 1:6.

Паралельно з проведенням мікробіологічного скринінгу залишкових кількостей антибіотиків було виконано серію експериментів із застосуванням імуноферментних експрес-тестів BIOEASY® Chloramphenicol Test Strip, РІДАСКРІН® ХАФ та CHARM® ROSA Chloramphenicol TEST (рис. 3). Оскільки на основі попередніх експериментів в трьох повторах – мікробіологічний скринінг хлорамфеніколу виявився неефективним методом.



Рис. 3. Набори імуноферментних експрес-тестів для якісного виявлення хлорамфеніколу в харчових матрицях: а – BIOEASY® Chloramphenicol Test Strip; б – РІДАСКРІН® Хлорамфенікол; в – CHARM® ROSA Chloramphenicol TEST

Особливу увагу приділено тест-набору РІДАСКРІН® ХАФ, який реалізує принцип конкурентного імуноферментного аналізу. В основі його функціонування лежить специфічна взаємодія молекули антибіотика з антитілами, іммобілізованими на мікротитраційних планшетах [45]. Для підвищення достовірності результатів було використано стандартні розчини різних концентрацій, кон'югат хлорамфеніколу з пероксидазою, а також систему буферів і хромогенних субстратів, оптимізованих виробником для відтворюваного сигналу. Вибір саме конкурентного формату ІФА зумовлений тим, що молекула хлорамфеніколу є низькомолекулярною сполукою і не може одночасно зв'язувати два антитіла [43-45].

Пробопідготовка зразків передбачала багатоступеневу обробку з метою усунення жирових і білкових компонентів, які можуть перешкоджати взаємодії антиген-антитіло. Для цього проводили гомогенізацію, відновлення сухих матриць, обробку реагентами осадження білків, центрифугування та екстракцію органічними розчинниками (етилацетат, n-гексан) із подальшим випарюванням у струмені азоту [43-45].

На початковій стадії дослідження стрипи розміщували у рамці планшета з фіксацією координат лунок, відведених для стандартних та досліджуваних розчинів. У подальшому у відповідні лунки вносили по 50 мкл стандартних і досліджуваних зразків та по 50 мкл кон'югату, після чого вміст перемішували легким постукуванням по краях планшета і залишали інкубувати при температурі 20–25 °C протягом 30 хв.

Після інкубації реакційну суміш видаляли, залишкову вологу усували трикратним постукуванням планшета об поверхню, накриту фільтрувальним папером, та здійснювали промивання шляхом внесення у кожну лунку 250 мкл буфера з наступним видаленням надлишку рідини; загалом промивання повторювали не менше трьох разів. Далі у кожну лунку додавали по 100 мкл субстрату/хромогену, перемішували та інкубували за кімнатної температури у темряві протягом 15 хв, після чого реакцію зупиняли додаванням 100 мкл стоп-реагенту з подальшим перемішуванням. Вимірювання оптичної густини

здійснювали не пізніше ніж через 30 хв після внесення стоп-реагенту при довжині хвилі 450 нм [45].

Тест-система BIOEASY® Chloramphenicol Test Strip реалізує принцип конкурентного імуноферментного аналізу за механізмом взаємодії антиген–антитіло, аналогічно набору РІДАСКРІН®, проте у форматі тест-смужок, що забезпечує швидкість та зручність виконання. Тест CHARM® ROSA Chloramphenicol TEST базується на лонгфлоу-імунохроматографічному принципі, який дозволяє за 10–15 хв визначати залишки хлорамфеніколу без складних підготовчих процедур. Інтенсивність кольорової лінії на смужці знижується зі зростанням концентрації аналізованої сполуки (рис. 4.) [47].

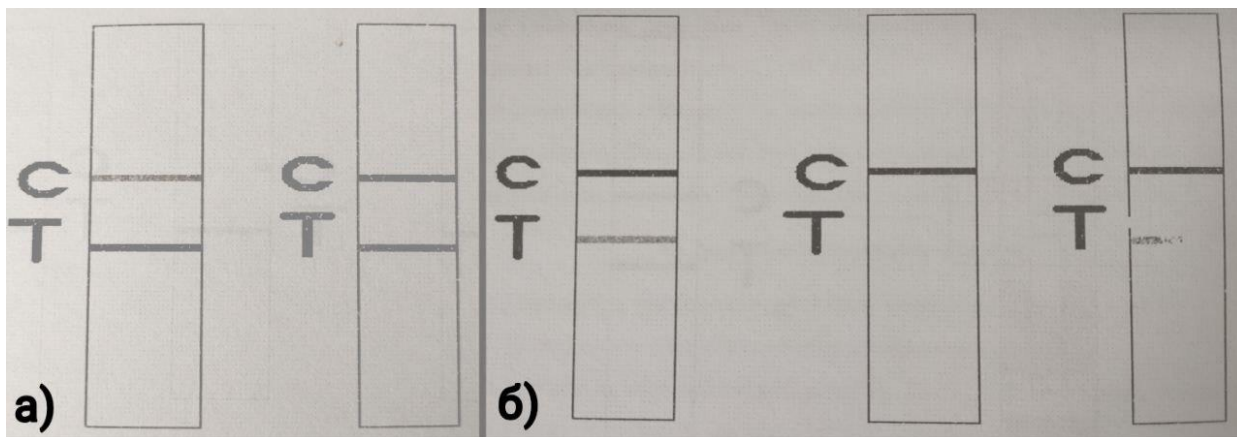


Рис. 4. Інтерпретації результатів тесту CHARM®: а – негативний (Т-лінія темніша, ніж С-лінія; Т і С –однакового кольору); б) позитивний (Т світліша за С; Т відсутня або частково знебарвлена) [47]

Усі зазначені експрес-тести ґрунтуються на єдиному принципі – імунологічному визначенні низькомолекулярних антибіотиків, проте реалізованому у різних форматах. Використання експрес-тестів у поєднанні з мікробіологічним скринінгом створює багаторівневу систему контролю, де ІФА виконує функцію швидкої верифікації та попереднього кількісного оцінювання перед застосуванням ВЕРХ як референтного методу.

Для проведення досліджень було підготовлено необхідні реактиви. Насичений розчин NaCl одержували розчиненням 31,6 г солі у 100 мл дистильованої води. Розчини NaOH (10%), оцтової кислоти (10%), Na₂CO₃ (2%) та KOH (10%) готували шляхом розчинення відповідних мас реагентів у

мірних колбах об'ємом 100 мл з доведенням до позначки дистильованою водою. Буферні розчини отримували шляхом розчинення 9,072 г KH_2PO_4 та 11,866 г Na_2HPO_4 у 1 л води з подальшим змішуванням до повного розчинення; фосфатний буфер готували розведенням 49,2 мл розчину Na_2HPO_4 у колбі об'ємом 100 мл з доведенням об'єму розчином KH_2PO_4 . Як елюент використовували суміш ацетонітрил–вода–дециламін (40:60:0,1), приготовлену змішуванням відповідних об'ємів компонентів.

У ході дослідження зразків молока 25 см³ продукту змішували з 12 г безводного сульфату натрію та тричі екстрагували етилацетатом (15 см³). Суміш центрифугували (15 хв, 4000 об/хв), після чого відбирали органічний шар. Очищення проводили послідовним промиванням насиченим розчином NaCl з додаванням 10% NaOH, насиченим розчином NaCl з 10% оцтової кислоти та чистим NaCl. Отриманий екстракт випарювали до мінімального об'єму, розчиняли у 3 см³ суміші ацетонітрил : вода (1:4) та піддавали трикратній екстракції петролейним ефіром, який віддаляли. Хлорамфенікол виділяли повторною екстракцією етилацетатом, після чого органічний шар висушували та розчиняли у 0,1 см³ метанолу (рис. 5).



Рис. 5. Пробопідготовка молочного зразку до випробування на вміст ЗКА

М'ясні зразки (10 г) гомогенізували з 15 см³ фосфатного буфера (0,025 М KH_2PO_4 + 0,025 М Na_2HPO_4 , рН 6,88) та тричі екстрагували етилацетатом (30 см³). Суспензію центрифугували, після чого відділяли органічний шар.

Очищення здійснювали за аналогічною схемою з використанням насиченого розчину NaCl з додаванням 10% NaOH, насиченого розчину NaCl з 10% оцтової кислоти та чистого NaCl. Далі екстракт упарювали на ротаційному випарювачі при 50 °С до мінімального об'єму, додавали 3 см³ суміші ацетонітрил : вода (1:4), проводили трикратну екстракцію петролейним ефіром, який віддаляли. Виділення хлорамфеніколу здійснювали екстракцією етилацетатом (3×5 см³), після чого органічний шар випарювали досуха та розчиняли у 0,1 см³ метанолу (рис. 6).

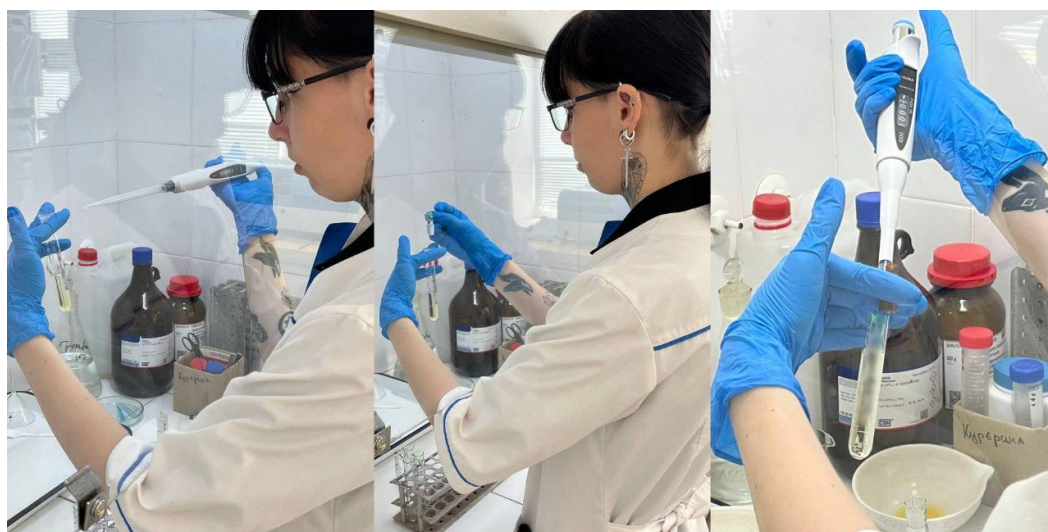


Рис. 6. Пробопідготовка м'ясного зразку до випробування на вміст ЗКА

Для кожного біологічного зразка було підготовлено spike-пробу шляхом внесення стандартного розчину з відомою концентрацією (рис. 7).



Рис. 7. Пробопідготовка м'ясного зразку до випробування на вміст ЗКА

Розрахунок проводили пропорційним методом: для 25 г зразка кількість внесеної речовини становила 0,25 мкг, а для 10 г – 0,1 мкг. Виходячи з концентрації стандартного розчину (10 мкг/мл), об'єм додавання складав відповідно 25 мкл та 10 мкл.

Закол та хід дослідження проводили відповідно до робочих інструкцій, затверджених на сектор. Інтерпретація результатів хроматографічного аналізу здійснювалася з використанням програмного забезпечення «МультиХром», алгоритми якого автоматично виконували інтегрування піків та обчислення концентрацій досліджуваних сполук (додаток Б, В, Д). Ідентифікація антибіотиків проводилася за часом утримування відносно стандартних зразків, тоді як кількісна оцінка базувалася на площі хроматографічних піків, що знаходиться у пропорційній залежності від концентрації аналіту.

Програмний модуль застосовував вбудований алгоритм розрахунку, який включав порівняння площ піків досліджуваних зразків із відповідними значеннями стандартних розчинів та визначав вміст антибіотиків у перерахунку на мг/кг (рис. 8а).

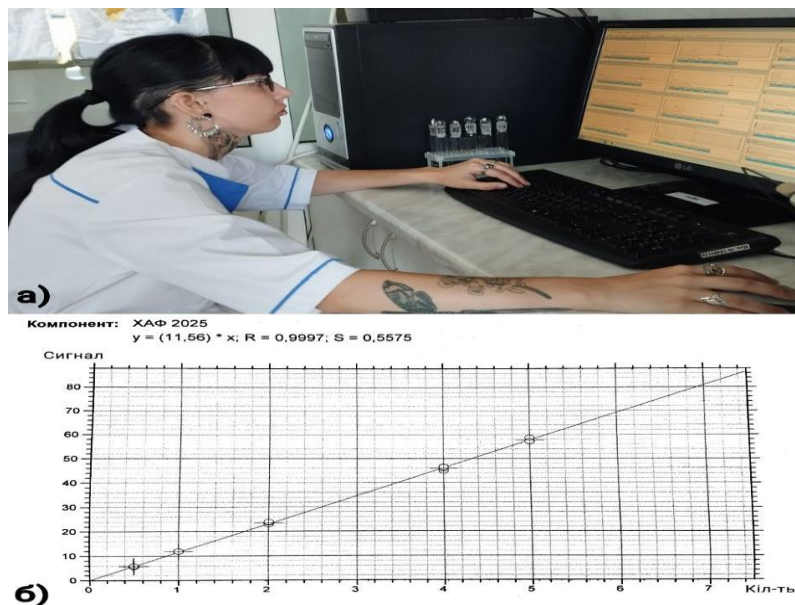


Рис. 8. Інтерпретація результатів: а – робота з ПЗ «МультиХром»; б – калібрувальна крива для методу обрахунку ЗК хлорамфеніколу, рівняння калібрування $y = 11,56x$ характеризується високою лінійністю ($R = 0,9997$) та прийнятною точністю ($S = 0,5575$), що відповідає валідаційним вимогам

При цьому враховувалися параметри калібрувальної кривої (рис. 8б), маса проби та об'єм розчинника. За кінцеве значення приймалося середнє арифметичне двох паралельних визначень, автоматично згенероване системою та округлене до п'ятого десяткового знаку. У випадку, якщо програмне забезпечення фіксувало перевищення допустимих меж збіжності між паралельними вимірюваннями, виконували повторний аналіз із новими пробами. Такий алгоритм обробки забезпечував високу відтворюваність, стандартизованість і мінімізацію похибок, зумовлених людським фактором.

Економічну ефективність розробленого методу визначали відповідно до чинних методичних вказівок із розрахунку собівартості лабораторних досліджень та економічного обґрунтування впровадження аналітичних методик. Оцінювання здійснювали шляхом порівняння операційних витрат на проведення аналізів різними методами з урахуванням матеріальних, енергетичних та трудових складових. Дослідження діючих тарифів і вартості аналітичних процедур проводили на основі експертиз відділу ВПРЗОД, що забезпечило достовірність та практичну обґрунтованість розрахунків економічної доцільності застосування ВЕРХ-УФ методу визначення хлорамфеніколу.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Компаративний аналіз взаємодії тест-культур з еталонними антибіотиками

Для оцінки відповідності тест-культур еталонним антибіотикам та дослідження механізму їхньої антибіотикорезистентності було проведено серію експериментів з використанням дослідного ряду чашок Петрі. У кожній чашці по дві лунки заповнювали стандартними робочими розведеннями еталонних антибіотиків об'ємом $0,05 \text{ см}^3$ (рис. 9). У дослідженні застосовували три еталонні препарати: стрептоміцин сульфат, бензилпеніцилін натрієву сіль та цинкбацитрацин, що дозволило порівняти їхній вплив на тест-культури та визначити чутливість мікроорганізмів до кожної групи антибіотиків.



Рис. 9. Внесення стандартних розчинів у дослідні чашки Петрі

Отримані результати (табл. 4.) демонстрували чутливість досліджуваних тест-культур до еталонних антибіотиків, що сприяло подальшому аналізу можливих механізмів антибіотикорезистентності. Порівняльний аналіз зон інгібування показав варіабельність реакції

мікроорганізмів на різні антибактеріальні препарати, що свідчить про специфічну дію кожного антибіотика залежно від особливостей клітинної структури бактерій.

Таблиця 4

Суміжність тест-культур з еталонними антибіотиками

Тест-культури мікроорганізмів	Стандартні робочі розведення еталонних антибіотиків		
	стрептоміцин сульфат (1000 мкг/см ³)	бензилпеніцилін (1000 мкг/см ³)	цинкбацитрацин (100 мкг/см ³)
<i>B. mycoides</i> ATCC 537	20 мм (+)	16 мм (+)	-
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	10 мм (-)	18 мм (+)	9,8 мм (-)
<i>M. flavus</i> ATCC 10240	-	-	19 мм (+)

При дослідженні тест-культури *B. mycoides* ATCC 537 було виявлено найбільші зони інгібування стрептоміцин сульфату (20 мм), тоді як бензилпеніцилін спричинив менш виражене пригнічення росту (16 мм) (рис. 10).

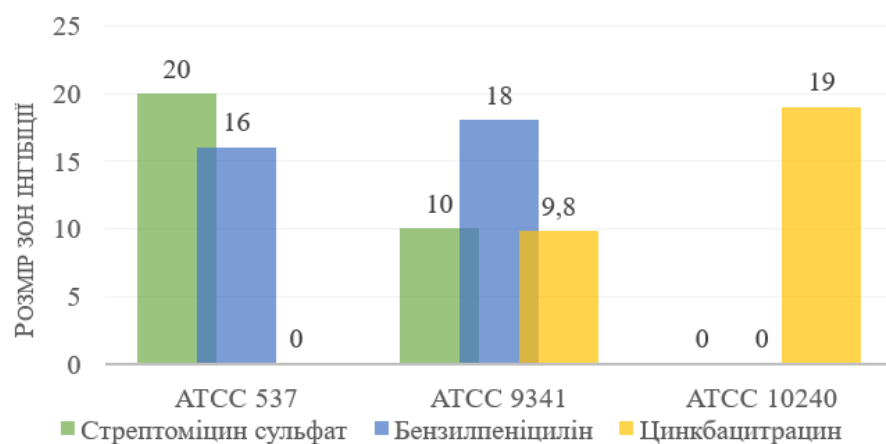


Рис. 10. Резистентність штамів до еталонних антибіотиків

У випадку цинкбацитрацину інгібування культури не спостерігалось, що свідчить про 100% резистентність тест-культури ATCC 537 до цього антибіотичного препарату.

Дослідження тест-культури *K. rhizophila* ATCC 9341 (рис. 11)

демонструє, що бензилпеніцилін утворив найбільшу зону інгібування діаметром 18 мм, тоді як зони інгібування навколо лунок із стрептоміцин сульфатом та цинкбацитрацином були слабо виражені (~10 мм).

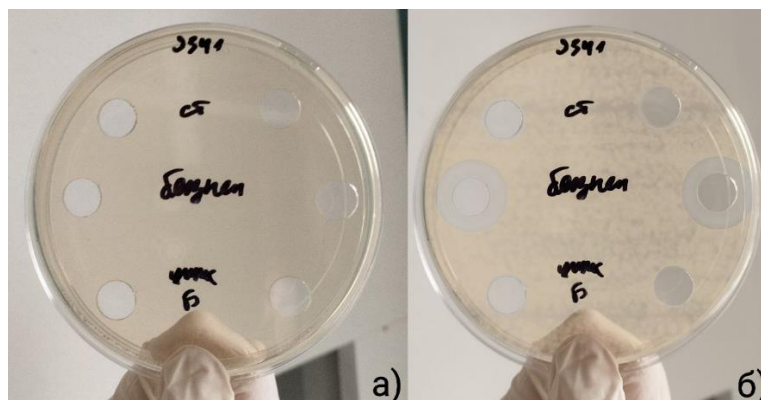


Рис. 11. Зони інгібування ATCC 9341:

а – підготовлена чашка Петрі; **б** - результат

У ході дослідження тест-культури *M. flavus* ATCC 10240 (рис. 12.) встановлено, що найбільш виражене пригнічення росту спричинив цинкбацитрацин, формуючи зону інгібування діаметром 20 мм. При застосуванні стрептоміцин сульфату та бензилпеніциліну інгібування росту бактерій не спостерігалось, що вказує на повну резистентність (100%) тест-культури ATCC 10240 до зазначених антибіотиків.

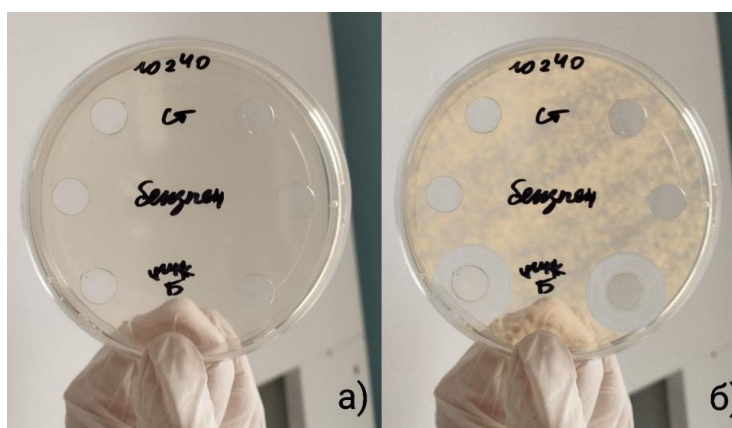


Рис. 12. Зони інгібування ATCC 10240:

а – підготовлена чашка Петрі; **б** - результат

Так, нами встановлено, що *B. tuscoides* ATCC 537 продемонстрував найбільшу чутливість до стрептоміцину, формуючи зону інгібування 20 мм,

тоді як бензилпеніцилін спричинив помірне пригнічення росту (16 мм), а до цинкбацитрацину бактерія була повністю резистентною. *K. rhizophila* ATCC 9341 значно пригнічувався лише бензилпеніциліном (18 мм), тоді як стрептоміцин і цинкбацитрацин мали слабкий ефект (~10 мм), що свідчить про підвищену резистентність до цих препаратів. *M. flavus* ATCC 10240 виявив високу чутливість до цинкбацитрацину (20 мм), а стрептоміцин і бензилпеніцилін не впливали на його ріст, що підтверджує повну резистентність до цих антибіотиків.

Таким чином, внаслідок компаративного аналізу взаємодії тест-культур мікроорганізмів з еталонами антибіотичних речовин було встановлено, що тест-культура *B. mycoides* ATCC 537 є суміжною з еталонами стрептоміцину та бензилпеніциліну. В той час коли на ріст *K. rhizophila* ATCC 9341 суттєво вплинув лише еталон бензилпеніциліну, а на *M. flavus* ATCC 10240, відповідно, лише еталон цинкбацитрацину.

3.2. Розрахунок біоактивності антибіотиків методом визначення залишкових антибіотиків

Ключовим підходом до оцінки залишкових антибіотиків є розрахунок біологічної активності антибіотиків, що дозволяє встановити кількісні показники активності антимікробних препаратів. З огляду на результати попередніх етапів дослідження, нами було поставлено серію експериментів мікробіологічного скринінгу залишкової кількості антибіотиків безпосередньо у продуктах харчування тваринного походження.

У межах дослідження було проведено визначення низки аналітичних показників, що характеризують наявність залишкових кількостей антимікробних препаратів у харчових продуктах тваринного походження. Зокрема, проаналізовано вміст стрептоміцину та пеніциліну у зразках вершкового масла (масова частка жиру – 73%), а також визначено концентрацію цинкбацитрацину у свинячому м'ясопродукті. Узагальнені

результати випробувань подано в таблиці 4.

Таблиця 4

Результати вимірювання діаметрів зон пригнічення росту тест-культур мікроорганізмів

Дослідна проба та показник	№ повтору	Діаметри зон інгібіції тест-культур, мм			
		1 розв. проби	Контроль	2 розв. проби	Контроль
Масло вершкове 73%, стрептоміцин	1	10,5	16,4	8,9	16,4
		11,8	16,4	9,8	16,4
		11,9	16,4	10,4	16,4
	X _{сер}	11,4	16,4	9,7	16,4
	2	10,3	16,4	8,5	16,4
		11,5	16,4	9,4	16,4
		11,8	16,4	10,0	16,4
	X _{сер}	11,2	16,4	9,3	16,4
Масло вершкове 73%, пеніцилін	1	12,7	17,1	11,9	17,1
		13,6	17,1	12,7	17,1
		14,2	17,1	13,2	17,1
	X _{сер}	13,5	17,1	12,6	17,1
	2	13,5	17,1	11,4	17,1
		14,0	17,1	12,3	17,1
		14,8	17,1	12,9	17,1
	X _{сер}	14,1	17,1	12,2	17,1
М'ясопродукт свинний, цинкбацитрацин	1	11,5	17,5	10,0	17,5
		12,3	17,5	11,0	17,5
		12,8	17,5	11,7	17,5
	X _{сер}	12,2	17,5	10,9	17,5
	2	11,0	17,5	10,3	17,5
		11,9	17,5	11,2	17,5
		12,5	17,5	11,8	17,5
	X _{сер}	11,8	17,5	11,1	17,5

Згідно методики розрахунку в середні значення зон пригнічення стандартного еталонного розведення антибіотиків кожної чашки вносили поправочний коефіцієнт до 17 мм. Після чого ця поправка вносила у величину зон пригнічення досліджуваної проби. Дані введених поправок, відповідно до кожного досліджуваного розведення, наведені в таблиці 5. Різниця діаметрів зон інгібіції при двох розведеннях кожної досліджуваної проби з урахуванням поправочного коефіцієнта становила для стрептоміцину – 1,8 мм, пеніциліну – 1,4 мм, цинкбацитрацину – 1 мм.

На основі визначених різниць діаметрів зон інгібування було проведено розрахунок біологічної активності антибіотиків відповідно до затверджених

методик.

Таблиця 5

Діаметри зон із врахуванням поправочних коефіцієнтів

Дослідна проба	Розведення	Зони, мм	Поправки	Зони з поправкою, мм	$X_{\text{сер}}$, мм
Масло вершкове 73%, стрептоміцин	1 розв.	11,4	+0,6	12,0	11,9
		11,2	+0,6	11,8	
	2 розв.	9,7	+0,6	10,3	10,1
		9,3	+0,6	9,9	
Масло вершкове 73%, пеніцилін	1 розв.	13,5	-0,1	13,4	13,7
		14,1	-0,1	14,0	
	2 розв.	12,6	-0,1	12,5	12,3
		12,2	-0,1	12,1	
М'ясопродукт свинний, цинкбацитрацин	1 розв.	12,2	-0,5	11,7	11,5
		11,8	-0,5	11,3	
	2 розв.	10,9	-0,5	10,4	10,5
		11,1	-0,5	10,6	

Величини різниць діаметрів зіставляли з референтними табличними даними для визначення біологічної активності. Результати коригувались з урахуванням поправочного коефіцієнта відповідно до кожної досліджуваної матриці, обрахованого за еталонними пробами. Отримані показники біоактивності подано у таблиці 6.

Таблиця 6

Результати мікробіологічного скринінгу біологічної активності залишкових антибіотиків

Дослідна проба та показник	C еталону, мкг/см ³	№ розведення	Результати з обрахунку розведень, мкг/см ³	Біологічна активність антибіотика, ОД/г
Масло вершкове 73%, стрептоміцин	2	1	0,280	0,552
		2	0,272	
		$X_{\text{сер}}$	0,276	
Масло вершкове 73%, пеніцилін	0,1	1	0,392	0,038
		2	0,372	
		$X_{\text{сер}}$	0,382	
М'ясопродукт свинний, цинкбацитрацин	2	1	0,066	0,132
		2	0,066	
		$X_{\text{сер}}$	0,066	

Встановлено, що розрахунок діаметрів зон інгібіції з урахуванням поправочного коефіцієнта дозволяє точно оцінити залишкову концентрацію

антибіотиків у досліджуваних пробах. За отриманими даними, стрептоміцин у вершковому маслі (73%) продемонстрував біологічну активність на рівні 0,552 ОД/г, пеніцилін – 0,038 ОД/г, а цинкбацитрацин у свинному м'ясопродукті – 0,132 ОД/г. Отримані результати демонструють, що стрептоміцин має найвищу біологічну активність серед досліджених антибіотиків, тоді як активність пеніциліну та цинкбацитрацину є нижчою, що свідчить про різний рівень залишкових концентрацій цих препаратів у продуктах харчування.

Так, це свідчить про варіативність залишкових концентрацій залежно від типу антибіотика та матриці зразка. При цьому, встановлені показники біологічної активності відповідають допустимим нормам, що свідчить про відсутність перевищення гранично допустимих рівнів залишкових антибіотиків у досліджуваних зразках. Отримані дані підтверджують ефективність мікробіологічного методу у виявленні залишкових антибіотиків та в подальшому використовуються для моніторингу якості харчових продуктів, зокрема тваринного походження. Водночас, з огляду на обмежену селективність і напівкількісний характер мікробіологічного скринінгу, для достовірного визначення концентрацій залишкових кількостей антибіотичних препаратів доцільним є застосування підтверджених методів ВЕРХ.

3.3. Визначення рівня перехресної реактивності та ризику хибних результатів експрес-тестів

Виходячи з того, що в процесі дослідження залишкових кількостей антибіотиків експериментально не було підтверджено достатню ефективність мікробіологічного скринінгу у виявленні хлорамфеніколу, на подальших етапах роботи застосовувались імуноферментні методи аналізу.

Основною метою цього етапу дослідження було кількісне визначення рівня перехресної реактивності тест-систем до структурно споріднених

сполук і статистичне оцінювання ризику хибнопозитивних та хибнонегативних результатів порівняно з розробленим референтним методом ВЕРХ.

Для визначення точності та аналітичної придатності досліджуваних ІФА-тестів були розраховані діагностичні характеристики порівняно з референтним ВЕРХ-методом (табл. 7)

Таблиця 7

**Діагностичні характеристики ІФА експрес-тестів при виявленні
хлорамфеніколу (n = 120)**

Тест-система	TP	FP	FN	TN	Se, %	Sp, %	Acc, %	PPV, %	NPV, %
BIOEASY®	17	6	1	96	94,4	94,1	94,2	73,9	99,0
РІДАСКРІН®	16	10	2	92	88,9	90,2	90,0	61,5	97,9
CHARM® ROSA	15	16	3	86	83,3	84,3	84,2	48,4	96,6

Примітка: TP – істинно позитивні результати, FP – помилково позитивні результати, FN – помилково негативні результати, TN – істинно негативні результати.

Отримані результати (табл. 7) засвідчили, що тест-система BIOEASY® Chloramphenicol Test Strip продемонструвала найвищі показники чутливості (94,4 %) і специфічності (94,1 %), що свідчило про її найкращу узгодженість із результатами ВЕРХ. Для РІДАСКРІН® Хлорамфенікол спостерігалася задовільна чутливість (88,9 %), однак дещо вищий рівень хибнопозитивних реакцій, що могло бути зумовлено матричними інтерференціями. Тест CHARM® ROSA мав нижчі показники точності (84,2 %) і PPV (48,4 %), що свідчило про підвищений ризик хибних результатів і потребу у підтвердженні результатів розробленим референтним методом.

Для підтвердження аналітичної специфічності було оцінено рівень перехресної реактивності з найбільш імовірними інтерферентами (табл. 8). Рівень перехресної реактивності для всіх досліджуваних тест-систем не перевищував 10 %, що повністю узгоджується з вимогами міжнародних нормативів щодо аналітичної специфічності, визначених Регламентом ЄС 2021/808. Такий показник свідчить про відсутність суттєвих неспецифічних

взаємодій між реагентами тест-системи та структурно спорідненими сполуками, що є важливою характеристикою достовірності отриманих аналітичних результатів.

Таблиця 8

Рівень перехресної реактивності експрес-тестів щодо структурно споріднених сполук

Сполука-інтерферент	BIOEASY, %CR	РІДАСКРІН, %CR	CHARM, %CR	Оцінка
Florfenicol	5,0	4,0	6,0	прийнятна
Thiamphenicol	8,0	7,0	9,0	прийнятна
Chloramphenicol-glucuronide	2,5	3,0	2,0	прийнятна
Oxytetracycline	1,0	1,2	0,8	прийнятна
Penicillin G	0,5	0,6	0,4	прийнятна

Найнижчі значення перехресної реактивності (%CR) були встановлені для метаболіту *Chloramphenicol-glucuronide* (2,0–3,0 %), що вказує на високу специфічність і селективність антитіл до вихідної молекули хлорамфеніколу.

Отримані дані підтвердили, що ІФА експрес-тести, особливо BIOEASY®, забезпечували належний рівень чутливості й селективності для використання на етапі первинного скринінгу. Усі досліджувані системи продемонстрували низьку перехресну реактивність (<10 %), що свідчило про відсутність значущих хибних реакцій із близькими за структурою антибіотиками. Найвищу узгодженість із ВЕРХ-методом показала тест-система BIOEASY®, що характеризувалася співвідношенням істинно позитивних до хибних результатів 17:7 та рівнем точності понад 94 %. РІДАСКРІН® і CHARM® ROSA виявили дещо нижчі показники, що може бути пов'язано з відмінностями у складі буферів або стабільності імунореагентів у матрицях із високим вмістом білків і жирів.

Таким чином, отримані результати підтверджують високу здатність тест-системи селективно ідентифікувати цільову сполуку без суттєвого впливу структурно споріднених речовин або метаболітів, що зумовлює

високу точність, відтворюваність та аналітичну надійність визначень. Водночас, незважаючи на продемонстровану специфічність скринінгових методів, результати їх застосування підлягають обов'язковій верифікації за допомогою референтних аналітичних методів для підтвердження достовірності та аналітичної валідності отриманих даних.

3.4. Дослідження кореляції результатів скринінгових методів та ВЕРХ у контролі залишкових кількостей антибіотиків

Після визначення аналітичної специфічності та перехресної реактивності імуноферментних експрес-тестів постала потреба оцінити ступінь їхньої узгодженості з розробленим референтним методом ВЕРХ. В умовах державних лабораторій скринінгові методи застосовуються для швидкого виявлення потенційно контамінованих зразків, тоді як ВЕРХ використовується для подальшої кількісної ідентифікації та підтвердження результатів. Тому встановлення математично достовірного зв'язку між показниками обох методів дозволяє оптимізувати аналітичну схему, скоротити кількість хибних результатів і підвищити ефективність моніторингу залишків фармакологічних препаратів у продуктах тваринного походження.

3.4.1. Оцінювання валідаційних параметрів ВЕРХ-УФ як референтного методу визначення хлорамфеніколу

За відсутності більш точних інструментальних методів визначення хлорамфеніколу в лабораторії, що спеціалізується переважно на проведенні скринінгових досліджень залишкових кількостей антибіотиків, виникла необхідність у розробленні власного підтверджувального аналітичного підходу. З огляду на вимоги європейських нормативів до контролю ветеринарних препаратів у продуктах тваринного походження, для цих цілей

було розроблено та оптимізовано метод визначення хлорамфеніколу за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням (ВЕРХ-УФ).

У процесі дослідження було проведено валідацію методу високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням (ВЕРХ–УФ) для кількісного визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу в продуктах тваринного походження. З метою оцінки лінійності аналітичного сигналу методу ВЕРХ-УФ проведено побудову калібрувальної кривої (рис. 13) за стандартними розчинами хлорамфеніколу (ХАФ) у діапазоні концентрацій 0,01–0,1 мкг/мл.

Компонент: ХАФ 2025

$$y = (11,56) * x; R = 0,9997; S = 0,5575$$

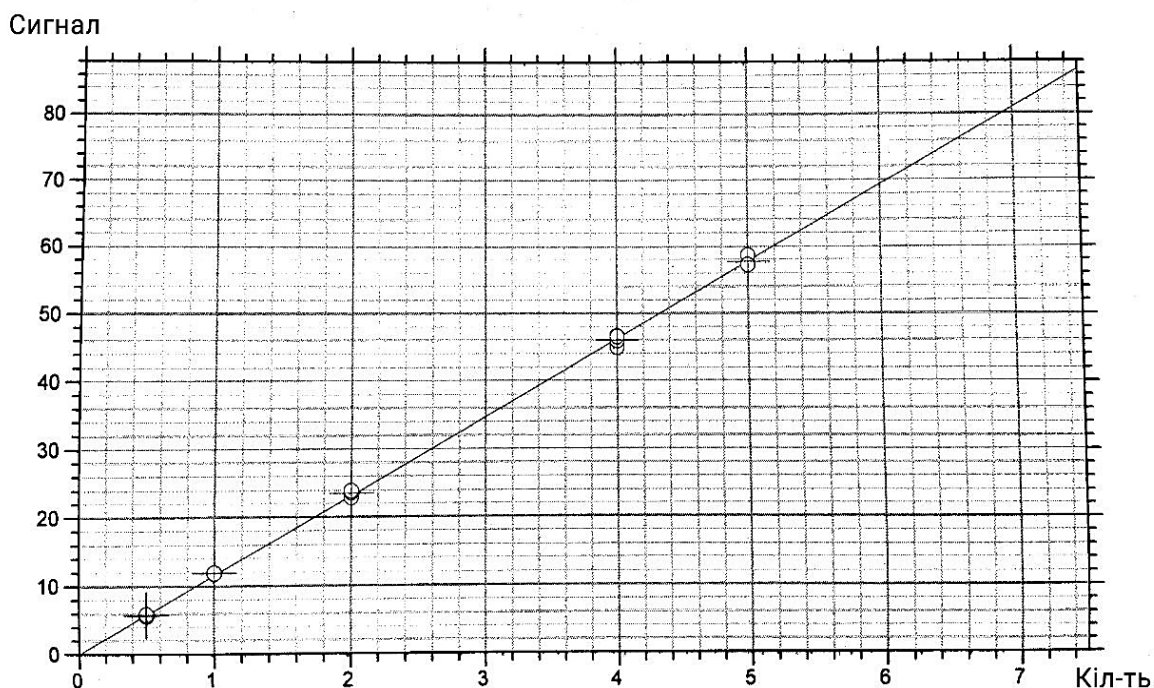


Рис. 13. Калібрувальний графік кількісного визначення ЗК ХАФ

Графічну залежність калібрувальної кривої побудовано на основі введення стандартних розчинів хлорамфеніколу у хроматографічну систему та подальшої обробки отриманих даних із використанням програмного забезпечення МультиХром. На графіку зображено співвідношення між концентрацією аналіту (по осі абсцис) та відповідним аналітичним сигналом

(по осі ординат). Що свідчить про прямолінійну залежність між концентрацією хлорамфеніколу та сигналом детектора.

Високе значення коефіцієнта кореляції $R = 0,9997$ підтверджує виняткову лінійність методу в досліджуваному діапазоні. Стандартне відхилення $S = 0,5575$ є прийнятним показником точності при проведенні кількісного аналізу відповідно до валідаційних вимог.

У таблиці 9 наведено експериментальні дані, отримані в результаті ін'єктування стандартних розчинів ХАФ у хроматографічну систему.

Таблиця 9

Значення калібрувальних рівнів (ХАФ)

№ п/п	Концентрація стандарту ХАФ, мкг/мл	Час виходу, хв	Сигнал, мВ
1	0,01	3,97	5,838
2	0,02	4,27	11,92
3	0,04	4,32	23,50
4	0,08	4,21	46,05
5	0,1	4,23	57,72

Отримані результати хроматографічного аналізу п'яти калібрувальних рівнів стандарту хлорамфеніколу (ХАФ) знаходилися у діапазоні концентрацій від 0,01 до 0,1 мкг/мл. Для кожного рівня час виходу аналіту становив від 3,97 до 4,32 хв та відповідний аналітичний сигнал був зареєстрований детектором у межах 5,838–57,72 мВ.

Спостерігалось поступове зростання сигналу пропорційно до концентрації, що підтверджує наявність прямолінійної залежності між кількісним вмістом ХАФ та його хроматографічною відповіддю.

У межах лабораторного дослідження референтного зразка № 003345п/25 – незбираного коров'ячого молока – було проведено аналіз на наявність ХАФ з використанням ВЕРХ. Вимірювання виконувались на хроматографічному приладі «UV 1000 SS» зі спектрофотометричним детектором.

У таблиці 10 представлені результати визначення відсотка повернення хлорамфеніколу на основі 10 паралельних вимірювань.

Таблиця 10

Контроль точності та правильності

Індекс	Результати												
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X _{сер}	SD мг/кг	RSD %
X _{пов} , мг/кг	0,009 882	0,0101 63	0,0098 16	0,0104 75	0,009 99	0,0102 89	0,0100 25	0,0101 82	0,0102 02	0,009 93	0,010 09	0,000 19	1,91
RP, %	98,82	101,63	98,16	104,75	99,85	102,89	100,25	101,82	102,02	99,29	100,9 5		

Таким чином, середнє значення повернутої кількості становить 0,01009 мг/кг, а середній відсоток повернення – 100,95%. Отримані значення стандартного відхилення (SD = 0,00019 мг/кг) та відносного стандартного відхилення (RSD = 1,91%) вказують на належну відтворюваність методу. Довірчий інтервал для середнього відсотка повернення розраховано в межах 99,59–102,31%, що свідчить про стабільність аналітичних результатів. Систематична похибка була низькою і становила – 0,0957, та суттєво не впливала на точність вимірювань. Відповідно до вимог регламенту ЄС (допустимий рівень відхилення – не більше 40%), отримані результати оцінюються як задовільні.

У таблиці 11 наведені результати обрахунку внутрішньолабораторної збіжності на основі 10 паралельних вимірювань референту.

Таблиця 11

Збіжність в ідентичних умовах випробування

Компонент	Результати												
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X _{сер}	SD мг/кг	RSD %
Вміст аналіту, мг/кг	0,009 06	0,008 15	0,008 23	0,008 31	0,008 39	0,009 39	0,009 46	0,009 54	0,013 37	0,009 21	0,00931	0,00145	15,56

Отже, середній вміст аналіту становив 0,00931 мг/кг, з SD = 0,00145 мг/кг і RSD = 15,56%, що вказує на помірну варіацію результатів у межах

допустимого діапазону. За рівня довірчої ймовірності 95% та при кількості вимірювань $n = 10$, коефіцієнт Ст'юдента = 2,23, а довірчий інтервал концентрації становить 0,00608–0,01254 мг/кг.

Оцінка прецизійності результатів проводилась з урахуванням нормативних критеріїв: значення $RSD_R = 32,00\%$, ГДК аналіту – 0,01 мг/кг, а розрахунковий показник концентрації $C = 0,00000001$ мг/кг. Водночас значення внутрішньолабораторної прецизійності RSD_r становить 21,12%, що нижче за критичне значення $RSD_R \times 0,66 = 21,12\%$, що нижче за критичне значення, а отже – відповідає вимогам нормативів.

У таблиці 12 представлені результати контролю внутрішньолабораторної відтворюваності визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу (ХАФ) у референтному матеріалі.

Таблиця 12

Контроль внутрішньолабораторної відтворюваності

№ п/п	Позначення умов	Результати						
		X_1	X_2	X_3	X_4	$X_{\text{сер}}$	SD мг/кг	RSD %
1	A	0,00815	0,00823	0,00831	0,00839	0,00827	0,00009	1,04
	a	0,00854	0,00862	0,00869	0,00877	0,00865	0,00009	0,99
2	B	0,00892	0,00979	0,00908	0,00915	0,00923	0,00033	3,56
	b	0,00931	0,00939	0,00946	0,00954	0,00942	0,00009	0,91
3	C	0,00969	0,00977	0,00985	0,00992	0,00981	0,00009	0,88
	c	0,01289	0,00808	0,00885	0,01012	0,00998	0,00183	18,33

Тож, було проведено дослідження відтворюваності результатів у трьох серіях вимірювань, які виконувалися за аналогічних умов, але в різний час або різними виконавцями (групи умов А–а, В–b, С–с). Для кожної серії було розраховано середнє арифметичне значення, стандартне відхилення (SD, мг/кг) та відносне стандартне відхилення (RSD, %). Усі серії, за винятком серії с ($X_{\text{сер}} = 0,00998$ мг/кг; $RSD = 18,33\%$), продемонстрували задовільну прецизійність (RSD від 0,88 % до 3,56 %), що свідчить про стабільність результатів за контрольованих умов. Для оцінки впливу змін умов виконання аналізу обчислено різниці між парами груп умов: $D_a = -0,00154$; $D_b = -$

0,000754; $D_c = -0,000703$. На підставі цих значень визначено стандартне відхилення різниць між серіями, яке становило 0,00151 мг/кг, що суттєво нижче за нормативне граничне значення SD ($< 0,5$ мг/кг), установлене для даного методу. Коефіцієнт варіації міжсерійної повторюваності (S_R) склав 1,51 мг/кг, а розширена невизначеність (U) при коефіцієнті охоплення $k = 2$ становила 0,00302 мг/кг. Отже, отримані результати підтверджують задовільну відтворюваність методу, а також його придатність до застосування для кількісного контролю залишкових кількостей хлорамфеніколу в продуктах тваринного походження.

У таблиці 13 наведено результати 10 повторних вимірювань, на основі яких здійснено розрахунок стандартної невизначеності методу визначення вмісту аналіту.

Таблиця 13

Визначення стандартної невизначеності

Компонент	Результати												
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X _{сер}	SD мг/кг	RSD %
Вміст аналіту, мг/кг	0,01258	0,01436	0,007231	0,01337	0,00785	0,00792	0,00860	0,00846	0,00923	0,009615	0,00992	0,00242	24,41

Було здійснено 10 незалежних вимірювань концентрації аналіту в зразку, за результатами яких обчислено середнє значення ($X_{сер} = 0,00992$ мг/кг), стандартне відхилення ($SD = 0,00242$ мг/кг) та відносне стандартне відхилення ($RSD = 24,41\%$), що свідчить про належну відтворюваність методу.

Для кількісної оцінки точності визначення також обчислено стандартну невизначеність (u), яка відображає ступінь розсіювання результатів вимірювань відносно середнього значення. Розрахунок здійснено за класичною статистичною формулою для серії повторних вимірювань. Встановлене значення стандартної невизначеності становить 0,00015 мг/кг, що підтверджує високу аналітичну чутливість і надійність методу при

визначенні низьких концентрацій хлорамфеніколу.

У результаті виконання комплексу валідаційних процедур було підтверджено ефективність та аналітичну придатність методу вискоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням (ВЕРХ-УФ) для кількісного визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу в харчових продуктах тваринного походження.

Отримані результати підтвердили відповідність методу вимогам Decision 2002/657/ЕС та свідчать про високу відтворюваність вимірювань при низьких концентраціях аналіту, що підтверджується низькими значеннями стандартного відхилення та відносної стандартної невизначеності. Метод дозволяє достовірно ідентифікувати хлорамфенікол на рівнях, які відповідають європейському мінімальному рівню продуктивності (MRL), що становить 0,3 мкг/кг, і навіть нижче, що вказує на достатню чутливість і відповідність сучасним нормативно-методичним вимогам до контролю заборонених фармакологічно активних речовин.

3.4.2. Порівняльний аналіз результатів скринінгових і референтних методів визначення хлорамфеніколу в біологічних матрицях

Для встановлення аналітичної узгодженості між різними підходами до контролю залишкових кількостей антибіотиків у біологічних зразках було проведено порівняльне дослідження результатів трьох методів: мікробіологічного скринінгу, ІФА із застосуванням експрес-тестів BIOEASY® та ВЕРХ-УФ як референтного методу. Таке співставлення є необхідним для оцінювання аналітичної надійності скринінгових процедур, які широко використовуються на етапі попереднього контролю безпечності харчових продуктів тваринного походження.

Для зразків молочної продукції було проведено 10 випробувань мікробіологічного скринінгу. Отримані результати біологічної активності

становили від 0,038 до 0,552 ОД/г (табл. 14), що свідчить про наявність інгібуючих речовин (ймовірних залишків антибіотиків) у зразках.

Таблиця 14

**Молочна продукція: результати мікробіологічного скринінгу
та ВЕРХ-УФ-аналізу ЗКА**

№ зразка	Мікробіологічний скринінг (ОД/г)	Бензилпеніцилін (нг/кг)	Стрептоміцин (нг/кг)	Цинкбацитрацин (нг/кг)
1	0,038	9,3	20,8	10,4
2	0,055	10,4	25,4	15,7
3	0,120	15,9	30,6	20,3
4	0,215	18,1	35,5	25,1
5	0,330	22,6	40,4	30,2
6	0,410	25,7	45,2	35,4
7	0,460	20,9	50,3	40,1
8	0,500	15,9	55,7	45,2
9	0,522	12,6	60,1	50,4
10	0,552	8,7	65,2	55,3

Однак інгібіційні тести є попередніми та характеризуються низькою специфічністю і відносною залежністю від умов аналізу. Натомість ВЕРХ-УФ дозволяє ідентифікувати та точно кількісно вимірювати конкретні антибіотики.

Експериментально нами було виявлено, що метод ВЕРХ-УФ може досягати меж чутливості нижче нормативних MRL. На практиці це означає, що навіть при негативному результаті скринінгу ВЕРХ-УФ може виявити сліди залишків антибіотичного препарату. У проведених вимірюваннях жоден із визначених рівнів залишкових кількостей не наближався до рівнів MRL/NRL. Зокрема, для бензилпеніциліну (MRL = 4 мг/кг) виявлені рівні становили десятки нг/кг, тобто на порядок нижче нормативу.

Встановлено, що біоактивність антибіотиків у зразках молочної продукції, варіює у межах від 0,038 до 0,552 ОД/г. Такі значення свідчать про наявність залишкових кількостей антимікробних речовин, біологічна активність яких підтверджується співвідношенням між показниками ОД/г та

концентраціями антибіотиків, визначених методом ВЕРХ-УФ-аналізу. У зразках із вищими значеннями біоактивності зафіксовано підвищений вміст бензилпеніциліну (8,7–25,7 нг/кг), стрептоміцину (20,8–65,2 нг/кг) та цинкбацитрацину (10,4–55,3 нг/кг).

Аналіз кореляційних залежностей між результатами мікробіологічного скринінгу та ВЕРХ–УФ-аналізу для молочної продукції показав різний ступінь узгодженості залежно від природи визначуваного антибіотика. Так, для бензилпеніциліну коефіцієнт Пірсона становив 0,22958, що вказує на слабку позитивну кореляцію між результатами двох методів і може бути зумовлено різною чутливістю скринінгової та хроматографічної детекції до даного класу β -лактамних сполук. Натомість для стрептоміцину (0,97946) та цинкбацитрацину (0,97845) встановлено високий рівень кореляції, що підтверджує взаємну узгодженість отриманих результатів і свідчить про придатність мікробіологічного скринінгу для попередньої ідентифікації залишків цих антибіотиків у молочній сировині.

Для м'ясних зразків отримані результати біологічної активності методом мікробіологічного скринінгу становили від 0,097 до 0,147 ОД/г (табл. 15).

Таблиця 15

**М'ясна продукція: результати мікробіологічного скринінгу
та ВЕРХ-УФ-аналізу ЗКА**

№ зразка	Мікробіологічний скринінг (ОД/г)	Бензилпеніцилін (нг/кг)	Стрептоміцин (нг/кг)	Цинкбацитрацин (нг/кг)
1	0,097	8,1	30,8	15,1
2	0,102	15,2	35,2	20,3
3	0,107	12,1	40,1	25,0
4	0,112	20,4	45,4	30,7
5	0,117	25,6	50,6	35,3
6	0,122	30,1	55,3	40,0
7	0,127	18,3	60,4	45,6
8	0,132	22,4	70,1	50,7
9	0,137	17,1	75,0	55,1
10	0,142	19,8	80,2	60,8

Виявлені концентрації також перебувають у діапазоні декількох десятків нг/кг, що в рази менше за фактичні гранично допустимі величини. Для м'ясної продукції визначено аналогічну тенденцію між показниками біоактивності антибіотиків (0,097–0,147 ОД/г) і концентраціями виявлених речовин за результатами ВЕРХ-УФ-аналізу. Концентрації бензилпеніциліну варіювали в межах 8,1–19,8 нг/кг, стрептоміцину – 30,8–52,0 нг/кг, а цинкбацитрацину – 15,1–60,8 нг/кг, що свідчить про наявність слідів антибіотичних препаратів. В свою чергу, коефіцієнт Пірсона для бензилпеніциліну становив 0,48440, що свідчить про середній рівень кореляції між результатами двох методів. Для стрептоміцину (0,99659) та цинкбацитрацину (0,99983) виявлено надзвичайно високу лінійну кореляцію, що підтверджує високу достовірність і повторюваність даних між мікробіологічним скринінгом і ВЕРХ–УФ-детекцією.

В свою чергу, ІФА експрес-тести застосовані для виявлення хлорамфеніколу у всіх видах продукції не дали жодного позитивного результату. Це означає, що в межах чутливості ІФА залишки були на рівні слідів або відсутні. Водночас застосування ВЕРХ-УФ дозволило зафіксувати наявність антибіотика (табл. 16) на рівнях, значно нижчих за мінімальну вимогу до робочого ліміту виявлення ($MRL = 0,3 \text{ мкг/кг}$ або 300 нг/кг). Встановлено чіткі відмінності у чутливості та аналітичній відтворюваності застосованих методик. Дані свідчать, що ІФА експрес-тести не виявили жодного позитивного результату (ND), тоді як високоефективна рідинна хроматографія з ультрафіолетовим детектором забезпечила кількісне визначення хлорамфеніколу у всіх досліджуваних матрицях. Концентрації антибіотика варіювали в межах 15,1–23,6 нг/кг для молочної продукції, 2,5–6,7 нг/кг для яєць та 2,4–91,6 нг/кг для м'ясних зразків. Виявлені варіації значень свідчать про відмінності у метаболічному накопиченні хлорамфеніколу залежно від типу біологічної матриці, що може бути зумовлено специфікою тканинної дифузії та ступенем зв'язування сполуки з білковими компонентами сировини.

Таким чином, отримані результати демонструють, що ІФА-метод, незважаючи на зручність та оперативність виконання, має обмежену межу виявлення і не забезпечує достатньої чутливості для фіксації залишкових кількостей антибіотика на рівнях, нижчих за MRL (300 нг/кг). Натомість ВЕРХ-УФ виявив здатність реєструвати хлорамфенікол у нанограмових концентраціях, що підтверджує його аналітичну селективність і придатність для кількісного контролю навіть за низьких рівнів контамінації.

Таблиця 16

**Порівняльні результати ІФА-скринінгу (BIOEASY®) та ВЕРХ-УФ
виявлення хлорамфеніколу в продукції тваринництва**

№ зразка	Досліджувана матриця зразка	ХАФ BIOEASY	ХАФ ВЕРХ-УФ, нг/кг
1.1	1. Молоко та молочна продукція	ND	15,1
1.2		ND	16,8
1.3		ND	17,5
1.4		ND	18,3
1.5		ND	19,0
1.6		ND	20,2
1.7		ND	21,4
1.8		ND	22,5
1.9		ND	23,0
1.10		ND	23,6
2.1	2. Яйця та суха яєчна продукція	ND	2,5
2.2		ND	3,1
2.3		ND	3,9
2.4		ND	4,4
2.5		ND	4,9
2.6		ND	5,4
2.7		ND	5,9
2.8		ND	6,2
2.9		ND	6,5
2.10		ND	6,7
3.1	3. М'ясо та м'ясна продукція	ND	2,4
3.2		ND	6,0
3.3		ND	13,5
3.4		ND	27,2
3.5		ND	44,0
3.6		ND	60,1
3.7		ND	75,3
3.8		ND	85,0
3.9		ND	90,7
3.10		ND	91,6

Примітка: ND – (Not Detected) Не виявлено.

Найвищі концентрації антибіотика спостерігалися у м'ясних матрицях, що узгоджується з відомими механізмами біоаккумуляції у тканинах з високим вмістом білка. Водночас усі визначені рівні були істотно нижчими за нормативну межу MRL, що свідчить про відсутність перевищення регламентованих норм безпечності та задовільний санітарний стан досліджуваної продукції.

При цьому, отримані результати підтверджують доцільність комплексного підходу до контролю залишкових кількостей антибіотиків, який поєднує скринінгові та референтні методи. Отримані результати свідчать про ефективність поєднаного використання скринінгових і хроматографічних підходів для комплексного контролю залишкових кількостей антибіотиків у біологічних матрицях тваринного походження. Така стратегія дає змогу підвищити достовірність моніторингу, зменшити ризик хибно-негативних висновків, забезпечити оцінку потенційної біоаккумуляції антибіотиків у харчових ланцюгах і гарантувати відповідність досліджень вимогам EFSA та стандарту ISO 17025. Розроблений ВЕРХ-УФ метод, завдяки високій точності, відтворюваності та межі виявлення, значно нижчій за встановлену MRL, може бути рекомендований для використання у системі рутинного лабораторного моніторингу харчової продукції тваринного походження на вміст залишкових кількостей антибіотиків (зокрема, хлорамфеніколу) з метою гарантування її безпечності та відповідності міжнародним регламентам.

3.5. Економічна частина

Миколаївська регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби фінансується з двох основних джерел: загального фонду державного бюджету (централізовано, покриває близько 30 % витрат на заробітну плату, відрахування та комунальні платежі) та спеціального

фонду (кошти від платних послуг лабораторії). Спеціальний фонд використовують на оплату праці окремих категорій персоналу, закупівлю витратних матеріалів (КЕКВ 2210), діагностичних реагентів (КЕКВ 2220), послуги сторонніх організацій (ремонти, калібрування, акредитацію, міжлабораторні дослідження – КЕКВ 2240), комунальні витрати (КЕКВ 2270), підвищення кваліфікації (КЕКВ 2282) та капітальні інвестиції (КЕКВ 3110).

Незважаючи на зростання обсягів досліджень (зумовлене продовольчою безпекою та воєнним станом), економічна ефективність лабораторії дещо знизилася порівняно з довоєнним періодом (2021 рік). Це пов'язано, зокрема, із передислокацією частини міжлабораторних досліджень до ДНДІ, що зменшило навантаження та дохідність Миколаївської лабораторії. Водночас розширення співпраці з Держоператором тилу та участь у важливих проєктах свідчать про збільшення значущості лабораторії у державній системі контролю якості. Важливо також відзначити, що діяльність лабораторії тісно пов'язана з наданням конкретних послуг, а її економічна результативність значною мірою залежить від обсягів платних послуг та оптимізації операційних витрат.

За результатами аналізу операційних витрат за період 2024–2025 років було проведено економічне порівняння трьох підходів до визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу у продуктах тваринного походження – мікробіологічного БРТ-тесту, ІФА експрес-тесту та ВЕРХ-УФ методу. Метою такого порівняння є обґрунтування доцільності впровадження та використання розробленого ВЕРХ-УФ методу як базового аналітичного інструменту у практиці контролю залишкових кількостей антибіотиків, зокрема хлорамфеніколу, у лабораторіях Держпродспоживслужби.

До складу операційних витрат віднесено сукупність прямих і непрямих статей, пов'язаних з виконанням аналітичного визначення: витрати на реагенти та витратні матеріали, пробопідготовку, обслуговування та калібрування обладнання, комунальні послуги, оплату праці персоналу, а

також амортизаційні відрахування. При цьому основний акцент зроблено на розрахунку собівартості одного дослідження, оскільки саме цей показник визначає ефективність методу при великій кількості зразків і слугує критерієм вибору аналітичного підходу в умовах державної лабораторії.

Порівняльний аналіз (табл. 17) показав, що вартість одного дослідження хлорамфеніколу методом РХ-МС/МС становить 1639,12 грн. Враховуючи технічну спорідненість методів і нижчі витрати на експлуатацію та обслуговування, собівартість одного аналізу методом ВЕРХ-УФ визначена на рівні приблизно 80 % від вартості РХ-МС/МС, що становить 1311,30 грн за одне дослідження.

Таблиця 17

Порівняння операційних витрат різних методів визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу (2024–2025 рр.)

Метод дослідження	Собівартість одного аналізу, грн	Річна кількість досліджень, п	Загальні річні витрати, грн	Загальні витрати за 2024–2025 рр., грн	Характеристика методу
БРТ-тест (мікробіологічний скринінг)	218,42	483	105 497,86	210 995,72	Скринінговий, низька селективність, високий ризик хибнопозитивних результатів
ІФА-експрес-тест (BIOEASY®)	489,23	483	236 298,09	472 596,18	Скринінговий, середня чутливість, відсутня кількісна ідентифікація
ВЕРХ-УФ (розроблений метод)	1 311,30	483	633 366,90	1 266 733,80	Референтний метод, висока точність і відтворюваність, відповідає вимогам MRL
РХ-МС/МС (еталонний метод)	1 639,12	—	—	—	Високоточний, але економічно недоцільний для рутинного контролю

За наявного річного обсягу робіт – 483 дослідження, середні річні операційні витрати на проведення хроматографічного аналізу хлорамфеніколу складають 633 366,9 грн. У розрізі дворічного періоду (2024–2025 рр.) загальні витрати становитимуть 1 266 733,8 грн, що відповідає реалістичному навантаженню хроматографічного сектора при виконанні планових державних програм контролю.

Для порівняння, використання ІФА-експрес-тестів, собівартість яких становить 489,23 грн за дослідження, потребує 236 298,09 грн на рік, а застосування БРТ-тестів із собівартістю 218,42 грн – лише 105 497,86 грн на рік.

Таким чином, ВЕРХ-УФ-метод потребує вищих прямих операційних витрат у порівнянні з експрес-тестами. Однак така різниця є економічно виправданою з огляду на аналітичні переваги: хроматографічне визначення забезпечує значно вищу точність, селективність і достовірність результатів, що зменшує кількість сумнівних або хибнопозитивних проб, характерних для швидких тест-систем. Це, у свою чергу, скорочує потребу в повторних дослідженнях, оптимізує використання реагентів і робочого часу персоналу.

Метод ВЕРХ-УФ дозволяє ідентифікувати хлорамфенікол із високою відтворюваністю, виявляючи навіть низькі концентрації аналіту, що відповідають вимогам MRL, установленим нормативами Європейського Союзу та стандартами Codex Alimentarius. На відміну від БРТ та ІФА, які мають здебільшого скринінговий характер, хроматографічний метод забезпечує кількісну детекцію з високою аналітичною специфічністю. Це відкриває можливості для лабораторії не лише проводити внутрішній моніторинг, але й виступати у ролі референсного центру при проведенні міжлабораторних порівнянь, у тому числі в рамках міжнародних програм контролю під егідою МАГАТЕ або EFSA.

Додатковою перевагою є потенціал розширення спектра аналітів: використовуючи єдину хроматографічну систему, лабораторія може проводити одночасне визначення кількох груп антибіотиків у різних

матрицях, що значно підвищує пропускну здатність сектора і знижує питомі витрати у довгостроковій перспективі.

Загалом, впровадження ВЕРХ-УФ у визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу є економічно доцільним та стратегічно обґрунтованим рішенням, оскільки воно сприяє підвищенню достовірності аналітичного контролю, зменшує ризик невідповідностей у державному моніторингу, оптимізує використання ресурсів у довгостроковій перспективі та створює основу для розширення спектра досліджень лабораторії. Таким чином, попри більші короткострокові витрати порівняно з ІФА- чи БРТ-тестами, метод ВЕРХ-УФ забезпечує стійкий баланс між економічною ефективністю, аналітичною точністю та відповідністю сучасним вимогам до контролю безпеки харчових продуктів.

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ

Охорона праці є невід'ємним компонентом діяльності Миколаївської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби, зокрема її хіміко-токсикологічного відділу та суміжних секторів рідинної хроматографії й мікробіологічної експертизи. Специфіка цих структурних підрозділів полягає у щоденній роботі з потенційно небезпечними хімічними, токсикологічними та біологічними агентами, тому пріоритетом є забезпечення високого рівня професійної безпеки, мінімізація ризиків впливу шкідливих факторів і дотримання вимог чинного законодавства [47, 48].

Організація охорони праці в даних підрозділах здійснюється відповідно до Закону України «Про охорону праці», Закону України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення», ДНАОП 0.00-4.15-98 «Положення про розробку інструкцій з охорони праці», ДНАОП 0.00-8.03-93 «Порядок опрацювання та затвердження нормативних актів», а також Правил охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях. Ці нормативи визначають вимоги до безпеки праці, навчання персоналу, організації робочих місць, поводження з реактивами, отруйними сполуками, мікробіологічними культурами та патогенами [48, 49].

На рівні лабораторії діє система внутрішніх нормативних документів, що регламентує порядок виконання робіт у кожному структурному підрозділі. Зокрема, в хіміко-токсикологічному відділі розроблено понад 30 інструкцій із безпечного виконання аналітичних процедур, підготовки реактивів, роботи з рідинами, що містять леткі органічні сполуки, кислотами та лугами. Для сектору рідинної хроматографії передбачені інструкції з безпеки при роботі з органічними розчинниками (ацетонітрил, метанол, гексан, етилацетат), системами під тиском, ультрафіолетовими детекторами, компресорами та вакуумними насосами. У мікробіологічному секторі діють інструкції з біобезпеки, асептики та дезінфекції, що визначають порядок

поводження із культурами мікроорганізмів, тест-культурами та інфікованим біоматеріалом [47, 49].

Персонал усіх відділів випробувальної лабораторії проходить обов'язковий вступний, первинний, повторний та позаплановий інструктажі, а також щорічне навчання з охорони праці, пожежної безпеки та електробезпеки. Дані про проходження інструктажів фіксуються у спеціальних журналах установленої форми. Працівники, які контактують із токсичними речовинами або патогенними культурами, проходять попередні та періодичні медичні огляди згідно з наказом МОЗ України № 246 від 21.05.2007 р. «Про затвердження Порядку проведення медичних оглядів працівників певних категорій» [48, 50].

Робочі місця у хіміко-токсикологічному відділі обладнані витяжними шафами, системами локальної вентиляції, засобами для нейтралізації розлитих хімікатів (нейтралізуючі сорбенти, розчини соди, тіосульфату натрію, борної кислоти). Зберігання реактивів і стандартів здійснюється у металевих шафах з вентиляційними решітками відповідно до їхньої небезпеки та класу токсичності. Працівники зобов'язані працювати у лабораторному халаті, рукавичках, захисних окулярах та, за потреби, у респіраторі. Всі хімічні маніпуляції виконуються у витяжній шафі, а облік використання небезпечних речовин ведеться у спеціальних журналах [47, 49].

Сектор рідинної хроматографії має підвищені вимоги до електробезпеки та дотримання техніки роботи під тиском. Перед початком роботи проводиться візуальний огляд насосів, з'єднань, капілярів і детекторів. Забороняється експлуатація систем із пошкодженими ущільнювачами чи слідами витоку розчинника. Робота з флуориметричними або УФ-детекторами проводиться лише після повного екранування випромінювача. Для уникнення ураження електричним струмом усі установки заземлені, а їхній технічний стан контролюється метрологічною службою лабораторії [49, 50].

У секторі мікробіологічної експертизи дотримуються правил

біологічної безпеки рівня II (BSL-2). Робочі місця обладнані ламінарними шафами, бактерицидними лампами, автоклавами для стерилізації, дезінфекційними камерами та ємностями для знезараження інфікованого матеріалу. Вхід у зону роботи з тест-культурами дозволяється лише в спецодязі, халаті, шапочці, масці та рукавичках. Забороняється вживання їжі, зберігання особистих речей, використання відкритого полум'я. Всі операції з культурами проводяться з дотриманням асептики, а після завершення зміни робочі поверхні знезаражуються 5% розчином хлораміну або 70% етанолом [47, 49]. У разі розливу інфікованого або токсичного матеріалу діють аварійні протоколи. Працівник має припинити роботу, повідомити відповідальну особу, обробити уражену ділянку шкіри дезінфектантом, провести локалізацію розливу та взяти участь у подальшому знезараженні. Розбитий посуд або забруднені інструменти збираються пінцетом у металеві контейнери для подальшої утилізації шляхом автоклавування чи спалювання. Додатково приміщення обробляється бактерицидною лампою протягом 30–60 хв. [48, 50].

Особливу увагу у хіміко-токсикологічному відділі МРДЛДПСС приділено питанням безпечної утилізації лабораторних відходів, що є невід'ємною складовою системи управління охороною праці та біобезпекою. Утилізація здійснюється відповідно до принципів належної лабораторної практики (GLP) та вимог стандарту ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019, які передбачають суворий контроль за поводженням із небезпечними матеріалами на всіх етапах технологічного процесу. У відділі діє служба контролю умов праці, яка проводить регулярний моніторинг параметрів виробничого середовища, зокрема стану вентиляції, рівня освітлення, температурного режиму та концентрації шкідливих речовин у повітрі. Результати спостережень фіксуються у журналах технічного стану приміщень, що забезпечує простежуваність та оперативне реагування у випадку виявлення відхилень від нормативних показників. Керівники секторів несуть персональну відповідальність за дотримання працівниками

вимог охорони праці, проведення інструктажів, надання засобів індивідуального захисту та своєчасне усунення виявлених порушень [47, 50].

Система утилізації в лабораторії організована відповідно до санітарних і екологічних норм, із чітким розмежуванням потоків хімічних і біологічних відходів. Хімічні залишки реактивів збираються у спеціальні герметичні контейнери, маркуються із зазначенням складу, класу небезпеки та дати збору, після чого передаються на централізовану нейтралізацію або контрольоване спалювання. Біологічні відходи – зокрема культури мікроорганізмів, заражені проби та інші потенційно патогенні матеріали – підлягають обов’язковій дезінфекції та подальшому термічному знищенню у спеціалізованому утилізаторі (крематорії). До роботи з утилізатором допускаються лише особи, які пройшли інструктаж з охорони праці, мають відповідний допуск керівництва та ознайомлені з принципом його функціонування. Зокрема, призначені відповідальні особи – ветсанітари та оператори термічного утилізатора – проходять спеціальне навчання і діють згідно з наказом директора лабораторії. Всі роботи виконуються у спеціальному захисному одязі, гумових рукавичках, захисних окулярах та взутті з нековзною підошвою [47, 49].

Перелік відходів, що підлягають утилізації, суворо регламентується. Категорично заборонено спалювання ртутьвмісних сполук, легкозаймистих і вибухонебезпечних матеріалів, радіоактивних речовин, аерозольних балончиків та металевих предметів. Водночас масова частка пластикових і жировмісних відходів у завантаженні крематорію не повинна перевищувати 5 % від загальної маси. Такий підхід забезпечує не лише безпечність технологічного процесу, а й мінімізує негативний вплив на довкілля. Для контролю за виконанням процедур утилізації ведеться відповідна звітна документація, у якій фіксуються вид, обсяг і спосіб знищення кожної партії відходів [48, 50].

РОЗДІЛ 5

БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

Безпечна робота лабораторій, зокрема МРДЛДПСС, ґрунтується на принципах управління біологічним ризиком, превентивного контролю та дотримання вимог біобезпеки і біозахисту. Сучасні міжнародні стандарти визначають, що основою ефективної системи безпеки є ризик-орієнтований підхід, який передбачає науково обґрунтовану оцінку потенційних загроз на кожному етапі лабораторного процесу та впровадження адекватних протиепідемічних, технічних і організаційних заходів [51, 55]. Згідно з рекомендаціями ВООЗ і CDC, рівень біозахисних бар'єрів (рукавички, халати, біологічні кабінки, HEPA-фільтри, вентиляційні системи під негативним тиском) має відповідати ступеню небезпеки біологічного агента, з яким проводиться робота [51, 55]. Такий підхід забезпечує баланс між ефективністю досліджень і захистом персоналу, навколишнього середовища та населення.

В Україні поступово впроваджуються міжнародні стандарти якості та безпеки лабораторної діяльності. Важливою подією стало запровадження у 2025 р. стандарту ISO 15189:2022 «Медичні лабораторії – Вимоги до якості та компетентності», який змістив акценти у бік активного управління ризиками, безперервного вдосконалення процесів і оцінки результативності системи якості [53]. Стандарт передбачає процесно-орієнтований підхід до роботи лабораторій, де кожен етап дослідження супроводжується аналізом ризиків і документованими заходами безпеки. Водночас, міжнародні керівництва ВООЗ (Laboratory Biosafety Manual, 2020) і BMBL (6-те вид., 2020) стали базовими орієнтирами для локальної адаптації правил біобезпеки, формуючи інтегровану модель управління ризиками [51, 55]. На основі цих документів МРДЛДПСС формує свої внутрішні протоколи, що поєднують міжнародний досвід із національними регламентами, визначеними Центром громадського здоров'я України [53].

Система реагування лабораторії на надзвичайні ситуації охоплює як природні, так і техногенні ризики – від військових дій до можливих хімічних або біологічних інцидентів. За рекомендаціями ВООЗ, у разі воєнних загроз або ризику руйнування лабораторій необхідно забезпечити знищення або безпечне консервування патогенних зразків, щоб уникнути випадкових викидів небезпечних агентів [54]. Така стратегія передбачає створення планів оперативного реагування, які включають мобілізацію персоналу, контроль доступу, аварійне електропостачання, резервне зберігання реагентів і підтримання комунікації з рятувальними службами. Водночас особливу увагу приділено підготовці персоналу до дій у надзвичайних ситуаціях – евакуації, укриття, деконтамінації, реагуванню на хімічні або біологічні атаки. Міжнародні настанови з біобезпеки наголошують, що персонал має бути підготовлений не лише до лабораторних інцидентів, а й до «екстремальних сценаріїв» – стихійних лих, терористичних загроз чи воєнних дій [51, 54].

Діяльність лабораторії регламентується чинними українськими нормативами з цивільного захисту та хімічної безпеки. Згідно з Кодексом цивільного захисту України, лабораторний контроль є невід’ємною частиною системи моніторингу надзвичайних ситуацій, спрямованої на оцінку ризиків для населення і довкілля [56]. Закон України «Про забезпечення хімічної безпеки та управління хімічною продукцією» [57] визначає пріоритетність хімічної безпеки у процесах зберігання, транспортування та утилізації речовин. У практичній діяльності МРДЛДПСС це означає ведення хімічного обліку, маркування реагентів, постійний контроль стану зберігання, а також наявність аварійних планів реагування при витоках або викидах небезпечних сполук. Дотримання національного законодавства є частиною системи менеджменту безпеки та охорони праці лабораторії.

Високий рівень компетентності персоналу забезпечується систематичним навчанням, інструктажами та перевірками знань. Працівники проходять регулярні тренінги з користування інженерними засобами захисту (ламінарні бокси, автоклави, вентиляційні системи), засобами

індивідуального захисту (ЗІЗ) і діями в умовах НС [55]. ISO 15189 і ВООЗ рекомендують вести документовані записи про кожен етап підготовки персоналу, що дозволяє забезпечити простежуваність компетентності фахівців. Паралельно відпрацьовуються алгоритми взаємодії з рятувальними службами, включно з евакуаційними заходами та ліквідацією наслідків аварійних витоків.

Засоби індивідуального захисту становлять основний бар'єр безпеки між працівником і потенційно небезпечним середовищем. У МРДЛДПСС використовуються халати, комбінезони, рукавички, маски, респіратори N95, окуляри, фартухи, а також спеціальні дозиметри [55]. За рекомендаціями BMBL, лабораторний одяг не повинен покидати межі лабораторії, а після використання підлягає дезінфекції або знешкодженню. Вибір ЗІЗ визначається рівнем біологічного ризику, що встановлюється за результатами оцінки проведених процедур.

Зберігання небезпечних матеріалів, дезактивація рідких і твердих відходів, а також стерилізація інструментів здійснюються відповідно до міжнародних настанов CDC [55]. У лабораторії використовуються парові автоклави з двосторонніми шлюзами, що ізольовані від адміністративних приміщень. Процеси автоклавування супроводжуються HEPA-фільтрацією та контролем температурних параметрів, що запобігає потраплянню життєздатних мікроорганізмів у навколишнє середовище. Всі тверді медичні відходи після стерилізації утилізуються через ліцензовані компанії.

Критичною складовою безпеки є інженерно-технічні рішення. Лабораторія обладнана системою вентиляції з негативним тиском, яка підтримує напрямок повітряного потоку всередину приміщень, що запобігає поширенню забруднень [55]. Усі вентиляційні системи оснащені сигналізацією та датчиками тиску; у разі відхилення параметрів спрацьовує автоматичне оповіщення. Приміщення лабораторій мають герметичні стіни та двері, що дозволяє оперативно проводити дезактивацію у разі аварій. На

випадок відключення енергії лабораторія має резервне електроживлення для забезпечення безперервної роботи автоклавів і систем фільтрації повітря.

Останніми роками МРДЛДПСС значно підвищила свою стійкість до надзвичайних ситуацій. Завдяки підтримці МАГАТЕ лабораторія отримала сучасний генератор і систему ПЛР-аналізу Rotor-Gene Q, що забезпечує безперервність досліджень навіть за перебоїв електропостачання [58]. Це підвищило надійність зберігання біологічних матеріалів і реагентів, а також гарантувало безперервність моніторингу в прифронтових регіонах. Досвід МРДЛДПСС підтверджує, що системне поєднання міжнародних стандартів, державних нормативів і технічної підтримки забезпечує високий рівень готовності лабораторії до надзвичайних ситуацій, зберігаючи стабільність її роботи у період воєнних дій, епідемій чи техногенних катастроф.

РОЗДІЛ 6

ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

У процесі аналітичної діяльності лабораторії, де проводяться хроматографічні визначення залишкових кількостей антибіотиків, формується низка забруднюючих чинників, пов'язаних із утворенням відходів різного агрегатного стану – рідких, газоподібних і твердих. Джерела їх виникнення безпосередньо пов'язані з етапами пробопідготовки, аналітичними процедурами, експлуатацією хроматографічного обладнання та санітарно-побутовими процесами. З огляду на специфіку досліджень, у складі лабораторних відходів можуть міститися залишки органічних розчинників, мінеральних і органічних кислот, солі важких металів, буферні системи, а також сліди фармакологічно активних сполук, зокрема хлорамфеніколу. Це обумовлює необхідність чіткої ідентифікації джерел забруднення, їхньої класифікації та впровадження ефективної системи очищення і нейтралізації перед утилізацією.

Рідкі лабораторні відходи (стічні води) утворюються під час промивання посуду, підготовки зразків і приготування розчинів. До їх складу входять ацетон, ацетонітрил, метанол, фосфорна та оцтова кислоти, залишки солей важких металів і аналітів. Такі стічні води належать до хімічно забруднених і потенційно токсичних, тому їх видалення здійснюється лише через централізовану каналізаційну систему з обов'язковим попереднім очищенням. Для особливо небезпечних залишків застосовуються методи хімічної нейтралізації або сорбційного очищення. У випадках, коли рідкі відходи містять важкодеградуючі або токсичні компоненти, вони збираються в спеціальні контейнери й передаються на утилізацію відповідно до нормативних документів екологічної безпеки. Такий підхід забезпечує зменшення ризику потрапляння забруднюючих речовин у систему водовідведення й дозволяє підтримувати відповідність діяльності лабораторії санітарно-екологічним вимогам.

Газоподібні відходи формуються переважно при роботі з леткими органічними речовинами та під час термічного спалювання біологічних або хімічних залишків у лабораторному крематорії. До складу газових викидів входять вуглекислий газ, водяна пара, оксиди азоту та сірки, а також леткі органічні сполуки та продукти термічного розкладу реагентів. Для мінімізації впливу на атмосферу крематорій обладнано системами дожигання й фільтрації, які забезпечують відповідність рівнів емісій встановленим екологічним нормативам. Витяжні шафи, встановлені у всіх приміщеннях, де здійснюються операції з розчинниками, локалізують леткі випари в межах технологічної зони, що запобігає забрудненню повітряного середовища лабораторії.

Тверді відходи становлять найчисленнішу групу лабораторних залишків і відрізняються за походженням, складом і ступенем небезпечності. Вони включають використані рукавички, пробірки, шприци, фільтрувальний папір, картриджі для твердофазної екстракції, залишки реактивів, контаміновані аналітичні зразки, біологічні матриці (молоко, м'ясо, яйця) та елементи експрес-тест-систем. Частина цих відходів належить до III–IV класу небезпеки, оскільки може містити біологічно активні сполуки або фармакологічні речовини. Для їхнього тимчасового зберігання використовується яма Беккера – герметична споруда, призначена для ізоляції токсичних або потенційно інфікованих матеріалів до моменту утилізації. Біологічні зразки перед знищенням проходять автоклавування або спалювання в крематорії, що повністю відповідає принципам біобезпеки. Система поводження з твердими відходами включає їх сортування, накопичення, знешкодження та передачу спеціалізованим підприємствам для подальшої утилізації.

У цілому система управління відходами в лабораторії є багатокомпонентною та передбачає комплекс заходів – від встановлення джерел їх утворення до контролю за очищенням, збором і знешкодженням. Використання каналізаційної мережі, витяжних систем, крематорію й ями

Беккера забезпечує стабільний контроль за екологічними аспектами діяльності лабораторії та дозволяє дотримуватися вимог чинного природоохоронного законодавства.

Попри наявність технічних засобів мінімізації впливу на довкілля, система екологічної безпеки лабораторії має переважно фрагментарний характер. Основними технічними заходами є попередня нейтралізація стічних вод, автоклавування біологічних зразків і термічна утилізація твердих відходів. Водночас, обмеженість інформації про ефективність фільтраційної системи крематорію не дозволяє повною мірою оцінити екологічну безпеку цієї ділянки. Відсутність постійного екологічного моніторингу, систематичного обліку утворення та знешкодження відходів, а також недостатня регламентація процедур поводження з ними свідчать про потребу в організаційних змінах. Не призначено відповідальних осіб за управління відходами, не ведеться звітність, не розроблено локальні інструкції або стандартні операційні процедури щодо екологічної відповідальності персоналу.

З огляду на це, подальше вдосконалення системи екологічної безпеки має ґрунтуватися на інтеграції управління відходами в загальну систему якості лабораторії. Доцільно запровадити комплексний моніторинг обсягів і складу відходів, автоматизований облік утилізації, регулярний аудит санітарно-екологічного стану об'єктів зберігання та фільтраційних установок. Необхідним також є проведення навчань для персоналу з питань екологічної відповідальності, розроблення локальної екополітики й формалізація процедур екологічного контролю. Реалізація цих заходів забезпечить підвищення рівня екологічної безпеки, мінімізацію техногенного навантаження, відповідність діяльності сучасним вимогам сталого розвитку й збереження сприятливого стану навколишнього середовища в зоні функціонування лабораторії.

ВИСНОВКИ

1) Внаслідок компаративного аналізу аналізу взаємодії тест-культур мікроорганізмів з еталонами антибіотичних речовин було встановлено, що *B. mycoides* ATCC 537 продемонстрував найбільшу чутливість до стрептоміцину, формуючи зону інгібування 20 мм, тоді як бензилпеніцилін спричинив помірне пригнічення росту (16 мм), а до цинкбацитрацину бактерія була повністю резистентною. *K. rhizophila* ATCC 9341 значно пригнічувався лише бензилпеніциліном (18 мм), тоді як стрептоміцин і цинкбацитрацин мали слабкий ефект (~10 мм), що свідчить про підвищену резистентність до цих препаратів. *M. flavus* ATCC 10240 виявив високу чутливість до цинкбацитрацину (20 мм), а стрептоміцин і бензилпеніцилін не впливали на його ріст, що підтверджує повну резистентність до цих антибіотиків.

2) Встановлено, що розрахунок діаметрів зон інгібіції з урахуванням поправочного коефіцієнта дозволяє точно оцінити залишкову концентрацію антибіотиків у досліджуваних пробах. За отриманими даними, стрептоміцин у вершковому маслі (73%) продемонстрував біологічну активність на рівні 0,552 ОД/г, пеніцилін – 0,038 ОД/г, а цинкбацитрацин у свинному м'ясопродукті – 0,132 ОД/г. Отримані дані підтверджують ефективність мікробіологічного методу у виявленні ЗКА та в подальшому використовуються для моніторингу якості харчових продуктів. Водночас, з огляду на обмежену селективність і напівкількісний характер мікробіологічного скринінгу, для достовірного визначення концентрацій ЗКА доцільним є застосування підтверджених методів ВЕРХ.

3) Отримані результати перехресної реактивності підтвердили високу здатність тест-системи селективно ідентифікувати цільову сполуку без суттєвого впливу структурно споріднених речовин або метаболітів, що зумовлює високу точність, відтворюваність та аналітичну надійність визначень. Водночас, незважаючи на продемонстровану специфічність

скринінгових методів, результати їх застосування підлягають обов'язковій верифікації за допомогою референтних аналітичних методів для підтвердження достовірності та аналітичної валідності отриманих даних.

4) У результаті виконання комплексу валідаційних процедур було підтверджено відповідність методу вимогам Decision 2002/657/EC та свідчать про високу відтворюваність вимірювань при низьких концентраціях аналіту, що підтверджується низькими значеннями стандартного відхилення та відносної стандартної невизначеності. Метод дозволяє достовірно ідентифікувати хлорамфенікол на рівнях, які відповідають європейському мінімальному рівню продуктивності (MRL), що становить 0,3 мкг/кг.

5) Підтверджено доцільність комплексного підходу до контролю залишкових кількостей антибіотиків, який поєднує скринінгові та референтні методи. Отримані результати свідчать про ефективність поєднаного використання скринінгових і хроматографічних підходів для комплексного контролю залишкових кількостей антибіотиків у біологічних матрицях тваринного походження. Розроблений ВЕРХ-УФ метод, завдяки високій точності, відтворюваності та межі виявлення, значно нижчій за встановлену MRL, може бути рекомендований для використання у системі рутинного лабораторного моніторингу харчової продукції тваринного походження на вміст залишкових кількостей ХАФ.

6) Упровадження методу (ВЕРХ-УФ для визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу є науково та економічно виваженим підходом до підвищення ефективності лабораторного контролю. Незважаючи на відносно вищі первинні витрати порівняно з імуноферментними або мікробіологічними скринінговими тестами, використання ВЕРХ-УФ дозволяє досягти довгострокової економічної ефективності за рахунок зменшення витрат на повторні дослідження та оптимізацію лабораторних ресурсів. Метод також створює інфраструктурну основу для розширення спектра досліджуваних аналітів відповідно до актуальних стандартів ЄС та рекомендацій EFSA.

ПРОПОЗИЦІЇ

Для покращення практичної діяльності бактеріологічного відділу дослідження інфекційної патології пропонуємо:

1) З метою підвищення ефективності аналітичного контролю сектору РХ доцільним є оновлення приладової бази шляхом впровадження високопродуктивних систем UHPLC, оснащених багатоканальними детекторами (DAD, MS/MS), термостатованими автосемплерами та інтегрованим програмним забезпеченням для автоматизованої обробки і валідації результатів. Така модернізація сприятиме підвищенню точності та швидкості аналізів, зниженню трудомісткості операцій і розширенню спектра визначуваних контамінантів у складних харчових матрицях.

2) Для підвищення науково-методичної самостійності доцільним є створення методичного підрозділу на базі випробувальної лабораторії, який би відповідав за розробку, адаптацію та валідацію актуальних методик. Це дозволить оперативно впроваджувати нові методи відповідно до змін у законодавстві (наприклад, появи нових MRL, змін у реєстрах заборонених речовин), а також здійснювати внутрішню експертизу якості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pérez-López, A., & Pérez-Rodríguez, F. (2020). Antibiotic residues in food and their impact on human health. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 112–126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.003>
2. European Food Safety Authority (EFSA). (2021). Report on the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Journal*, 19(3), e06491. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6491>
3. Romero-González, R., Garrido Frenich, A., & Martínez Vidal, J. L. (2021). Residues of veterinary drugs in food: Current trends and future perspectives. *Journal of Chromatography A*, 1642, 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462472>
4. World Health Organization (WHO). (2020). Antibacterial agents in clinical development: An analysis of the antibacterial clinical development pipeline. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000193>
5. Li, Y., Zhang, W., & Liu, X. (2021). Toxicological evaluation of antibiotic residues in animal-derived food: A review. *Science of the Total Environment*, 777, 146063. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146063>
6. Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental research*, 169, 483–493.
7. Owusu-Doubreh, B., Appaw, W. O., & Abe-Inge, V. (2023). Antibiotic residues in poultry eggs and its implications on public health: a review. *Scientific African*, 19, e01456.
8. European Commission. (2019). Commission Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L 15, 1–72.
9. Gaudin, V., Hedou, C., & Cadieu, N. (2019). Comparison of microbial

and chromatographic methods for the detection of antibiotics in milk. *Food Control*, 96, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.011>

10. European Commission. (2023). RASFF – The Rapid Alert System for Food and Feed: Annual Report 2022. https://food.ec.europa.eu/safety/rasff_en

11. Van Boeckel T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 study – *PLoS Global Public Health*, 2023.

12. O'Neill J. et al. Antimicrobial resistance in livestock and associated human health risks – *MDPI Microorganisms*, 2023.

13. *Frontiers in Veterinary Science*. Alternatives to antibiotics for sustainable livestock production – *Frontiers*, 2025.

14. ISO 23970:2021. Foodstuffs — Determination of chloramphenicol by LC-MS/MS.

15. EFSA. Veterinary drug residues in animals and foods remain low – EFSA, 2023.

16. Baquero F. et al. Evolutionary pathways and trajectories in antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2021.

17. Felis E. et al. Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment—occurrence and implications. *Eur. J. Pharmacol.* 2020.

18. Singh S., Sharma R., Saini A. Antibiotic residues and resistance in food animals: global public health concerns. *J. Food Sci. Technol.* 2021.

19. Li J. et al. Occurrence and human health risks of veterinary antibiotics in different food products. *Food Chem.* 2020.

20. Zhang Q. et al. Risk assessment of chloramphenicol residues in raw bovine milk: a public health perspective. *Environ. Res.* 2021.

21. Chen D. et al. Probabilistic risk assessment of dietary exposure to chloramphenicol in food. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021.

22. Адамчук, Л., Постенко, В., Бал-Приліпко, Л., & Пилипко, К. (2022). Дослідження меду натурального на вміст залишків антибіотиків [Research of the content of antibiotic residues in natural honey]. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, (28), 37–44.

23. Ma, C.-C., Chen, L.-C., & Sun, H.-F. (2020). Degradation kinetics of streptomycin in aqueous solutions under varying temperature conditions: Implications for environmental fate. *Environmental Science & Technology Letters*, 7(2), 76–82.
24. Danish Aquaculture. (2020). Effect of heat treatments on stability of β -lactams in milk: Kinetic parameters including penicillin. *Journal of Dairy Science*, 93–101.
25. Zhang, T., Huang, J., & Wang, J. (2021). pH and temperature-dependent hydrolysis kinetics of bacitracin in aqueous environments. *Environmental Chemistry Letters*, 19(6), 4541–4550.
26. Yadav, K., & Kumar, V. (2021). Thermal stability of chloramphenicol in ophthalmic preparations: A 30-day study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(10), 3625–3631.
27. Liu, H., Zhang, Q., & Wu, Y. (2020). Microbiological screening and confirmation of antibiotic residues in food of animal origin. *Food Chemistry*, 328, 127134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127134>
28. Verdon, E., Couedor, P., & Sanders, P. (2019). Chloramphenicol: Chemistry, metabolism and residue detection. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(12), 1907–1922. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1667022>
29. Chen, D., Yu, J., & Zhang, H. (2021). Stability of veterinary drug residues during food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4593–4616. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12863>
30. Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
31. Ghimpețeanu, O. M., Pogurschi, E. N., Popa, D. C., Dragomir, N., Drăgoțoiu, T., Mihai, O. D., & Petcu, C. D. (2022). Antibiotic use in livestock and residues in food - A public health threat: A review. *Foods*, 11(10), 1430.
32. Wu, Q., Shabbir, M. A. B., Peng, D., Yuan, Z., & Wang, Y. (2021). Microbiological inhibition-based method for screening and identifying of antibiotic

residues in milk, chicken egg and honey. *Food Chemistry*, 363, 130074.

33. Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M. H., & Hussani, S. A. K. (2019). Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 6(3), 315.

34. Azirkina, I. M. (2021). Microbiological methods for detecting antibiotic residues in poultry products [Doctoral dissertation, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine]. NUBiP Repository. <https://dglibtest.nubip.edu.ua/items/b159eb58-216e-4aef-ab45-9833ef368ba8>

35. Finzi, A., Barbieri, S., & Rosi, V. (2023). Monitoring of antimicrobial residues in raw milk in Lombardy Region (Italy) by microbial inhibition and LC-HRMS methods. *Foods*, 12(7), 1341. <https://doi.org/10.3390/foods12071341>

36. Havryliuk, O., Khomiak, O., & Fesenko, V. (2023). Monitoring of antibiotic residues in raw milk in Ukraine: Screening and confirmatory approaches. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 6(2), 62–70. <https://doi.org/10.32718/ujvas6-2.12>

37. ujeta Uma & Ayenew Ashenef. (2023) Determination of some antibiotic residues (tetracycline, oxytetracycline and penicillin-G) in beef sold for public consumption at Dukem and Bishoftu (Debre Zeyit) towns, central Ethiopia by LC/MS/MS. *Cogent Food & Agriculture* 9:1.

38. Lakew, A., Megersa, N., & Chandravanshi, B. S. (2023). Validation of modified QuEChERS extraction method for quantitative enrichment of seven multiclass antibiotic residues from vegetables followed by RP-LC-UV analysis. *Heliyon*, 9(4).

39. Abedi-Firoozjah, R., Alizadeh-Sani, M., Zare, L., Rostami, O., Salim, S. A., Assadpour, E., ... & Jafari, S. M. (2024). State-of-the-art nanosensors and kits for the detection of antibiotic residues in milk and dairy products. *Advances in Colloid and Interface Science*, 328, 103164.

40. Pietschmann, J., Dittmann, D., Spiegel, H., Krause, H. J., & Schröper, F. (2020). A novel method for antibiotic detection in milk based on competitive magnetic immunodetection. *Foods*, 9(12), 1773.

41. European Union Reference Laboratories (EURLs). (2023). EURL guidance document on screening method validation: Requirements for sample preparation, specificity, matrix effects, validation, and quality control (QC). https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-XX_eurl-guidance-screening-validation.pdf
42. European Commission. (n.d.). Residues of veterinary medicinal products – Food safety. Retrieved November 3, 2025, from https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/veterinary-medicines-and-residues/residues-veterinary-medicinal-products_en
43. МВВ-5.4-185 «Кількісне визначення бензилпеніциліну в зразках харчової продукції» від 29.10.2020 р.
44. МВВ-5.4-186 «Кількісне визначення стрептоміцину в зразках харчової продукції» від 29.10.2020 р.
45. Методичні рекомендації з кількісного визначення хлорамфеніколу в зразках твердого сиру за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу Рідаскрін® Хлорамфенікол Art. N 1505 (виробник r-Biopharm, Німеччина). / [К.С. Мягка, Н.А. Меженська, О.А. Хіцька, М.В. Костюк]. – К., ДНДІЛДВСЕ, 2011. – 10 с.
46. Миколаївська регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини. Миколаївська регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби. URL: <https://vetlab.gov.ua/>
47. Бондаренко, М. Ю., & Сидоренко, А. П. (2022). Правові аспекти охорони праці: збірник наукових праць. Львів: Львівська політехніка.
48. Верховна Рада України. (2022). Про охорону праці: Закон України від 14.10.1992 № 2694-XII (станом на 13 грудня 2022 р.). URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694-12#Text>
49. Олійник, О. М., & Гордієнко, С. В. (2022). Основи охорони праці: теоретичні та практичні аспекти. Запоріжжя: ЗНТУ.
50. Міністерство охорони здоров'я України. (2023, 21 лютого). Наказ МОЗ України № 354 «Про затвердження державних санітарних норм і

правил. Санітарно-протиєпідемічні вимоги до новозбудованих, реставрованих і реконструйованих закладів охорони здоров'я та зміни до деяких нормативно-правових актів» [Нормативно-правовий акт]. URL: <https://moz.gov.ua/uk/decrees/nakaz-moz-ukraini-vid-21022023--354-pro-zatverdzhennja-derzhavnih-sanitarnih-norm-i-pravil-sanitarno-protiepidemichni-vimogi-do-novozbudovanih-restavrovanih-i-rekonstrujovanih-zakladiv-ohoroni-zdorov%E2%80%99ja-ta-zmin-do-dejakih>

51. World Health Organization. (2020). Laboratory Biosafety Manual (4th ed.). WHO.

52. World Health Organization. (2024). Laboratory Biosecurity Guidance. WHO.

53. Центр громадського здоров'я України. (2025). Впровадження ISO 15189:2022 в лабораторній діагностиці України. phc.org.ua.

54. Rigby, J., & Landay, J. (2022). WHO says it advised Ukraine to destroy pathogens in health labs. Reuters.

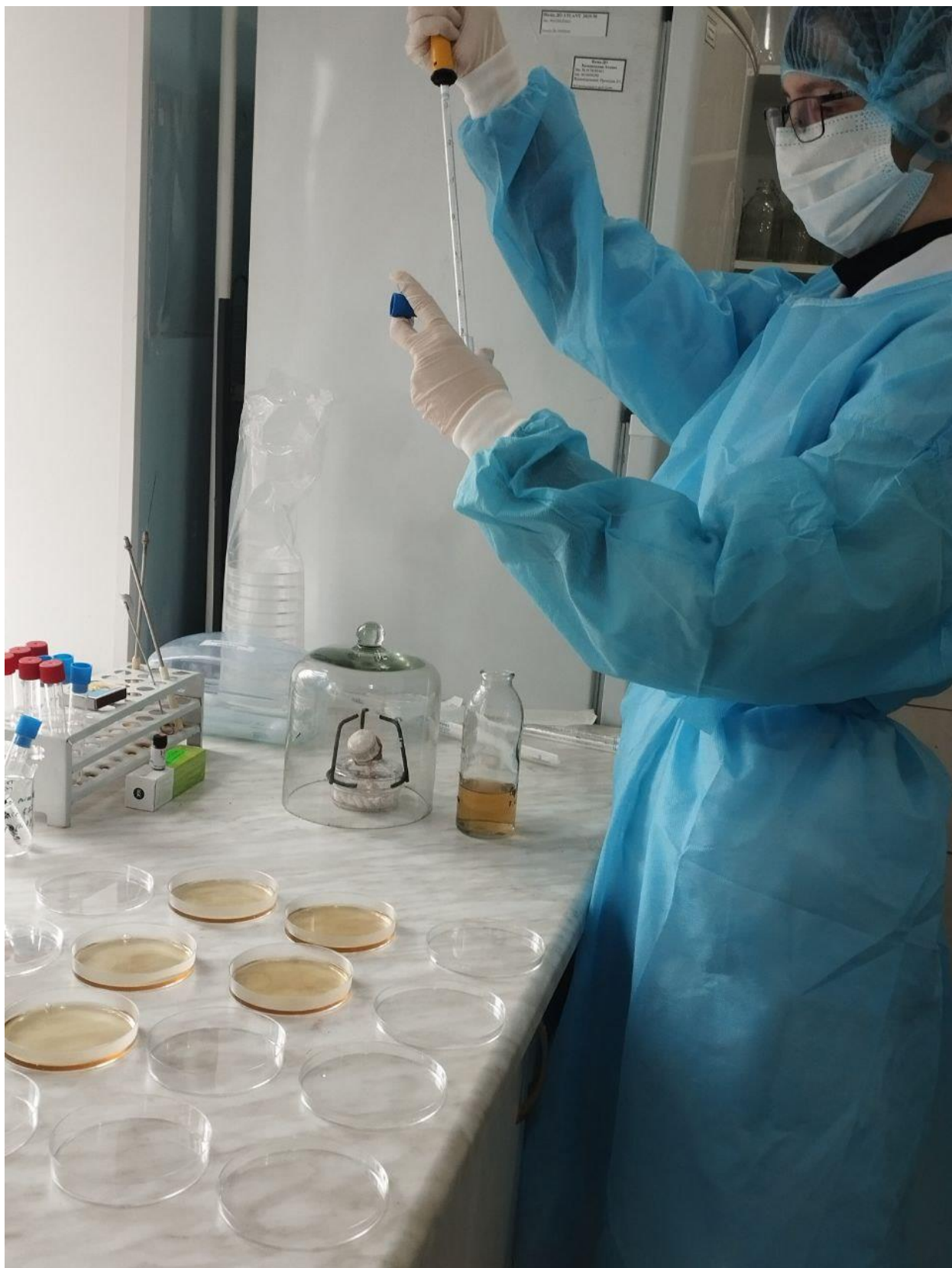
55. Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (6th ed.). U.S. HHS.

56. Кодекс цивільного захисту України (Закон № 5403-VI, 02.10.2012, із змінами 2025).

57. Закон України «Про забезпечення хімічної безпеки та управління хімічною продукцією» (№ 2804-IX, 01.12.2022).

58. Державна служба з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів України. (2023). Миколаївська лабораторія отримала генератор і сучасний ПЛР-системний прилад у рамках допомоги МАГАТЕ.

ДОДАТОК А



Внесення тест-культури у поживне середовище та розлив середовища по 10 мл у дослідні чашки Петрі

ДОДАТОК Б

ОТЧЕТ

Файл хроматограммы: D:\Analytical\Chrom 4.8\Data\UV-VIS\Chromatograms_1\ 2025_10_29\13-49-25.chr

Создан: 29.10.2025 13:49:25 Бодюл А.С.
 Изменен: 29.10.2025 14:14:10 Бодюл А.С.
 Проба: ХАФ д/бт №5998е/1/25 Сухе молоко знежирене
 Объем: 20 мкл
 Метод:
 Файл: _1
 Прибор: UV-VIS -> Прибор 1
 Колонка:

Канал UV-VIS

Сигнал, мВ

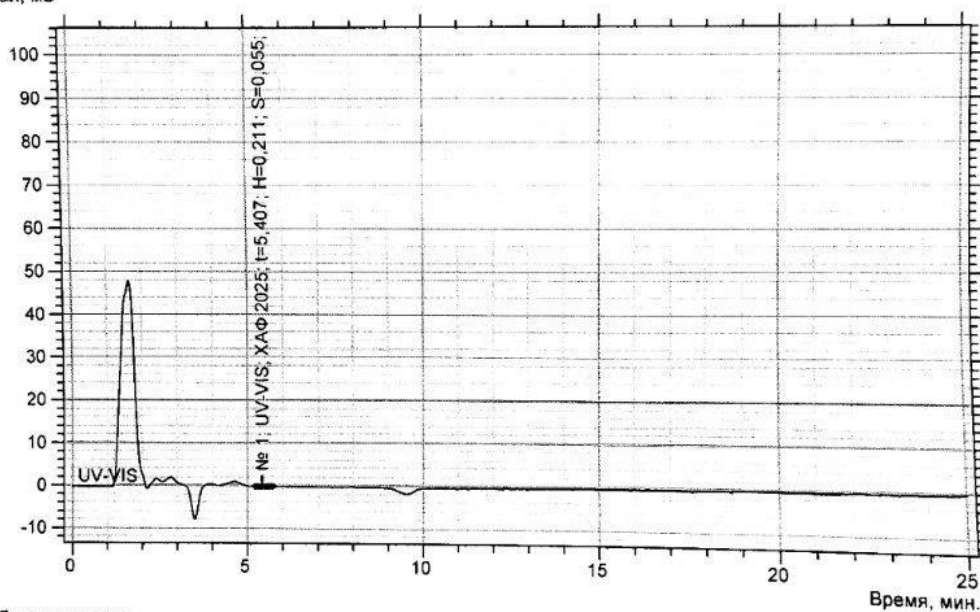


Таблица пиков

№	Канал	Вещество	Время, мин.	Высота	Площадь	Концентрация
1	UV-VIS	ХАФ 2025	5,407	0,21086	0,054514	0,0000236 мг/кг

Авто-сформований звіт про результати дослідження ЗК ХАФ у
матриці Сухе молоко знежирене

ДОДАТОК В

ОТЧЕТ

Файл хроматограммы: D:\Analytical\Chrom 4.8\ Data\ UV-VIS\ Chromatograms\ _1\ 2025_10_30\ 14-21-39.chr

Создан: 30.10.2025 14:21:39 Бодюл А.С.
 Изменен: 30.10.2025 14:48:02 Бодюл А.С.
 Проба: ХАФ д/бт №2367/2/25 М'ясопродукт свинний
 Объем: 20 мкл
 Метод:
 Файл: _1
 Прибор: UV-VIS -> Прибор 1
 Колонка:

Канал UV-VIS

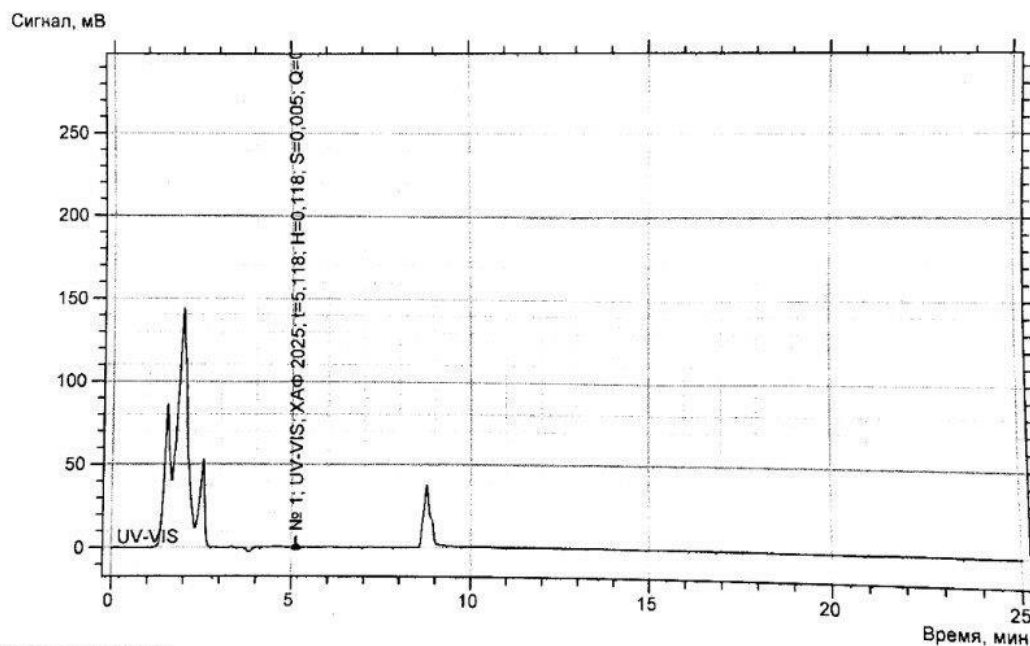


Таблица пиков

№	Канал	Вещество	Время, мин.	Высота	Площадь	Концентрация
1	UV-VIS	ХАФ 2025	5,118	0,11763	0,0054785	0,0000024 мг/кг

**Авто-сформований звіт про результати дослідження ЗК ХАФ у
матриці М'ясопродукт свинний**

ДОДАТОК Д

ОТЧЕТ

Файл хроматограммы: D:\Analytical\Chrom 4.8\Data\UV-VIS\Chromatograms_1\2025_10_29\14-40-14.chr

Создан: 29.10.2025 14:40:14 Бодюл А.С.
 Изменен: 29.10.2025 15:04:55 Бодюл А.С.
 Проба: ХАФ д/бт №6747п/2/25 Яйце куряче харчове
 Объем: 20 мкл
 Метод:
 Файл: _1
 Прибор: UV-VIS -> Прибор 1
 Колонка:

Канал UV-VIS

Сигнал, мВ

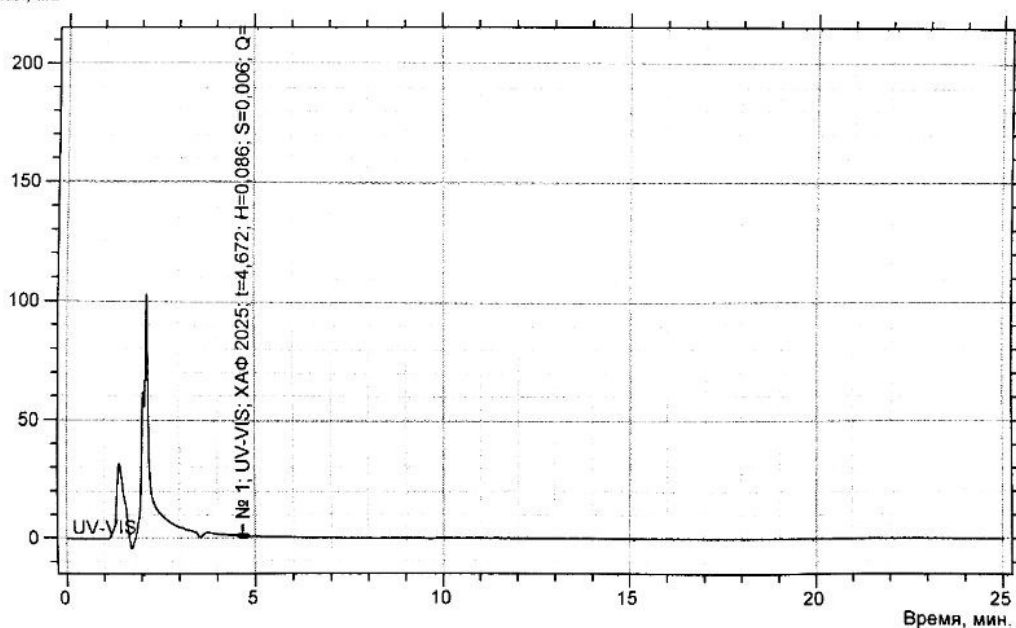


Таблица пиков

№	Канал	Вещество	Время, мин.	Высота	Площадь	Концентрация
1	UV-VIS	ХАФ 2025	4,672	0,085773	0,0057816	0,0000025 мг/кг

Авто-сформований звіт про результати дослідження ЗК ХАФ у матриці Яйце куряче харчове

ДОДАТОК Ж

ДЕРЖАВНА СПЕЦІАЛІЗАЦІЯ		НИ
УДІЛОВА СПЕЦІАЛІЗАЦІЯ		
ДЕРЖАВНА СПЕЦІАЛІЗАЦІЯ		
ДЕРЖАВНА СПЕЦІАЛІЗАЦІЯ		
Дл	уа	ська, ЗА
Вис.	01-13/214	про впровадження у виробництво результатів наукових досліджень
25	02	20 25 р.

Довідка

про впровадження у виробництво результатів наукових досліджень

Довідку складено про те, що студенткою було виконано впровадження у виробництво результатів наукової роботи на тему: «Вплив різних концентрацій розчинів еталонних антибіотиків на зони інгібіції тест-культур: *Bacillus mycoides*, *Micrococcus flavus*, *Kocuria rhizophila*».

У ході виконання роботи було оцінено економічну ефективність використання різних концентрацій розчинів еталонних антибіотиків на зони інгібіції тест-культур: *Bacillus mycoides*, *Micrococcus flavus*, *Kocuria rhizophila* в умовах Миколаївської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби України. Автором закладено мікробіологічний дослід та здійснено аналітичну обробку даних, проведено порівняльний аналіз впливу різних концентрацій розчинів еталонних антибіотиків на формування зон інгібіції тест-культур: *Bacillus mycoides*, *Micrococcus flavus*, *Kocuria rhizophila*.

У результаті проведеної роботи визначено пріоритетні напрями мікробіологічного скринінгу залишкових кількостей антибіотиків в харчових продуктах Миколаївської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби. Встановлено, що тест-культура *Bacillus mycoides* ATCC 537 продемонструвала чутливість до еталонних зразків стрептоміцину та бензилпеніциліну. Водночас ріст *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 суттєво пригнічувався лише під впливом бензилпеніциліну, тоді як для *Micrococcus flavus* ATCC 10240 ефективним виявився виключно цинкбацитрацин. Виявлено, що розмір зон інгібіції тест-культур безпосередньо залежав від концентрації застосованого антибіотика. При цьому, всі значення біологічної активності відповідають допустимим нормам, що підтверджує відсутність перевищення граничних рівнів залишкових антибіотиків. Отримані результати засвідчують ефективність мікробіологічного методу та можуть бути використані для подальшого моніторингу безпечності харчових продуктів. Внаслідок впровадження результатів наукової роботи, «Вплив різних концентрацій розчинів еталонних антибіотиків на зони інгібіції тест-культур: *Bacillus mycoides*, *Micrococcus flavus*, *Kocuria rhizophila*» в умовах Миколаївської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби підвищиться на 29,4-32,7%.

В.о. директора
Миколаївської регіональної
державної лабораторії Державної служби
України з питань безпеки харчових
продуктів та захисту споживачів



Довідка про впровадження у виробництво результатів досліджень

ДОДАТОК 3



ГО «Міжнародний центр наукових досліджень».
 Номер запису в Реєстрі громадських об'єднань: 1499141.
 Адреса: вул. Зодчих, буд. 40, офіс 103; м. Вінниця, Вінницька обл., 21037
 Організація функціонує як відокремлений підрозділ ТОВ «UKRLOGOS Group».
 ЄДРПОУ: 44574526
 IBAN: UA433052990000026002046104529
 Банк ВФ АТ КБ «ПриватБанк»; МФО 305299
 Свідоцтво суб'єкта видавничої справи: ДК № 7860 від 22.06.2023.

Д О В І Д К А

ПРО ПРИЙНЯТТЯ НАУКОВОЇ РОБОТИ ДО ПУБЛІКАЦІЇ

15.02.2025

Шановний(і) авторе(и):

Організаційний комітет з радістю повідомляє, що наукову роботу «EFFECT OF CONCENTRATIONS ANTIBIOTIC STANDARD ON THE INHIBITION ZONES OF TEST CULTURES» прийнято до публікації в збірнику наукових праць «SCIENTIA» за матеріалами VIII Міжнародної науково-теоретичної конференції «Theoretical and practical scientific achievements: research and results of their implementation» (21.02.2025, м. Ліверпуль, Англія, Велика Британія).

Опублікована робота буде доступна з 21.02.2025 за посиланням:

<https://previous.scientia.report/index.php/archive/issue/view/21.02.2025>

.....

Електронні сертифікати учасників конференції будуть доступні з 21 лютого.

Конференцію схвалено ResearchBib і включено до каталогу міжнародних конференцій на офіційному вебсайті Academic Research Index, а також та зареєстровано в базі даних науково-технічних заходів УкрІНТЕІ (Посвідчення № 114 від 06.01.2025). Матеріали конференції знаходитимуться в відкритому доступі (Open Access) на умовах ліцензії CC BY-SA 4.0 International.

З повагою,

Президент правління Міжнародного
 Центру Наукових Досліджень
МАРІЯ ГОЛДЕНБЛАТ



ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ 3

IST № 25/2102-006

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

0,5 ECTS credits



participated in the VIII International Scientific and Theoretical Conference

Theoretical and practical scientific achievements: research and results of their implementation

21.02.2025 | Liverpool, England, United Kingdom

and published scientific paper in the Collection of scientific papers «SCIENTIA»
with DOI 10.36074/scientia-21.02.2025 and ISBN 979-8-89660-287-3 (series) 

The conference is included in the Academic Resource Index ResearchBib catalog and registered in the UmrSTEI database (Certificate № 114 dated January 6, 2025);








President of the International
Center of Scientific Research
Registration number in the Unified Register of Public Associations: 1499141

MIRIAM GOLDENBLAT
www.scientia.report

