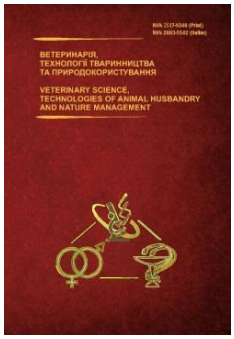

ВЕТЕРИНАРІЯ, ТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИННИЦТВА ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ

VETERINARY SCIENCE, TECHNOLOGIES OF ANIMAL HUSBANDRY AND NATURE MANAGEMENT

ISSN 2617-8346 (Print)
ISSN 2663-5542 (Online)

doi: 10.31890/vttp.2020.06.07
http://ojs.hdzva.edu.ua/

UDC 636.09:615.33:57.083.3:637.5

Validation of the method of quantitative determination of florphenicol in muscle samples by the method of immuno-enzyme analysis

M. V. Kostyuk, K. S. Myagka, G. S. Kochetova
State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 06.10.2020
Received in revised form 23.10.2020
Accepted 15.11.2020

State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine

E-mail: capma77@i.ua
katerina_miagka@meta.ua
kochetovag@ukr.net

Kostyuk, M. V., Myagka, K. S., & Kochetova, G. S. (2020). Validation of the method of quantitative determination of florphenicol in muscle samples by the method of immuno-enzyme analysis. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 6, 40-45. DOI: 10.31890/vttp.2020.06.07.

Introduction. *Amphenicols are a group of chemical compounds with antibacterial activity, including chloramphenicol (HAF), thiamphenicol (TAF), florfenicol (FF) and their derivatives. Florfenicol (FF) is a synthetic antimicrobial agent with a broad spectrum of action and is one of the most commonly used drugs in poultry, and was developed specifically for veterinary medicine. Given the wide range of activity of florfenicol, the high therapeutic effect combined with low toxicity makes it important for use in animal husbandry. The known method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) differs favorably from other screening methods by high sensitivity, specificity, simplicity and speed of performance, availability and stability of reagents, the ability to computer processing of measurement results and automation of test steps, which provides high test efficiency.*

The aim of the work. *To validate the method of enzyme-linked immunosorbent assay to determine the residues of florfenicol in the samples of months of different species of animals (cattle, pigs, chickens, geese, turkeys, rabbits) and fish.*

Materials and methods. *The research was conducted on the basis of the State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Expertise. The material for the study was a solution of florfenicol with a concentration of 1 mg/liter.*

Results of research and discussion. *It was found that the highest value (highest response) for control samples is 0.24 μg/kg and the lowest value for enriched samples (lowest response) - 3.62 μg/kg. According to the obtained results, none of the answers for the enriched samples coincides with the range of answers for the control samples. It follows that the detection ability (CCβ) for this screening method reduces or decreases 5.0 μg/kg The cut-off rate of this test is 3.62 μg/kg.*

Conclusions and prospects for further research. *Validation characteristics have been established for the determination of florfenicol residues in muscle samples, such as: detection ability (CCβ) is 5.0 μg/kg, cut-off level is 3.62 μg/kg. The lowest content of florfenicol that can be determined is 0.2 μg/kg. The percentage of return for enriched samples of both groups is 93 %, which corresponds to the specified production.*

Key words: *validation characteristics, muscles, enzyme-linked immunosorbent assay, florfenicol.*

Валидация методики количественного определения флорфеникола в образцах мышц методом иммуноферментного анализа

М. В. Костюк, К. С. Мягкая, Г. С. Кочетова
Государственный научно-исследовательский институт по лабораторной диагностике и ветеринарно-санитарной экспертизе, Киев, Украина

Амфениколы представляют собой группу химических соединений, обладающих антибактериальной активностью, включая хлорамфеникол (ХАФ), тиамфеникол (ТАФ), флорфеникол (ФФ) и их производные. Флорфеникол (ФФ) – синтетическое противомикробное средство с широким спектром действия, одно из наиболее часто используемых препаратов в птицеводстве, разработанное специально для ветеринарии. Учитывая широкий диапазон активности флорфеникола, высокий терапевтический эффект в сочетании с низкой токсичностью делает его важным для использования в животноводстве. Известный метод иммуноферментного анализа (ИФА)

выгодно отличается от других методов скрининга высокой чувствительностью, специфичностью, простотой и быстродействием, доступностью и стабильностью реагентов, возможностью компьютерной обработки результатов измерений и автоматизацией этапов тестирования, что обеспечивает высокую эффективность тестирования.

Валидация методики по определению остатков флорфеникола в образцах мышц разных видов животных (крупного рогатого скота, свиней, кур, гусей, индюков, кроликов) и рыбы методом иммуноферментного анализа.

Исследование проводилось на базе Государственного научно-исследовательского института по лабораторной диагностике и ветеринарно-санитарной экспертизе. Материалом для исследования служил раствор флорфеникола с концентрацией 1 мг/л.

Было обнаружено, что наибольшее значение для контрольных образцов составляет 0,24 мкг/кг, а наименьшее значение для обогащенных образцов - 3,62 мкг/кг. Согласно полученным результатам, ни одно из значений для обогащенных образцов не совпадает с диапазоном значений для контрольных образцов. Отсюда следует, что способность обнаружения (CCβ) для этого скрининг-метода – 5,0 мкг/кг. Пороговый уровень этого теста составляет 3,62 мкг/кг.

Установленные валидационные характеристики по определению остатков флорфеникола в образцах мышц, такие как: способность обнаружения (CCβ) составляет 5,0 мкг/кг, пороговый уровень – 3,62 мкг/кг. Уровень определения содержания флорфеникола, что может быть выявлен – 0,2 мкг/кг. Определение остаточных количеств флорфеникола проводили методом ИФА на спектрофотометре (ридер) «Tecan Sunrise» (производство «Sunrise», Австрия) с помощью тест-системы для конкурентного иммуноферментного анализа Kwinbon Biotech Florfenicol and Thiamphenicol (Cat.No .: KA12901H) (Китай).

Ключевые слова: *валидационные характеристики, мышцы, иммуноферментный анализ, флорфеникол.*

Валідація методики кількісного визначення флорфеніколу у зразках м'язів методом імуноферментного аналізу

М. В. Костюк, К. С. Мягка, Г. С. Кочетова

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ, Україна

Амфеніколи – група хімічних сполук з антибактеріальною активністю, до складу входять хлорамфенікол (ХАФ), тіамфенікол (ТАФ), флорфенікол (ФФ) та їх похідники. Встановлені валідаційні характеристики щодо визначення залишків флорфеніколу у зразках м'язів, такі як: здатність виявлення (CCβ) становить 5,0 мкг/кг, рівень відсічення – 3,62 мкг/кг. Найменший вміст флорфеніколу, що може бути визначеним – 0,2 мкг/кг.

Ключові слова: *валідаційні характеристики, м'язи, імуноферментний аналіз, флорфенікол.*

Вступ

Майже 60 відсотків усіх антибіотиків, що виробляються в світі, використовуються у гуманній медицині. Тваринницька галузь є другим за величиною споживачем антимікробних препаратів.

Загальновідомо, що залишки антимікробних препаратів, що знаходяться у продуктах харчування тваринного походження, окрім алергічних реакцій, можуть мати й іншу неприємну побічну дію на споживача продукції. Фермери використовують антибіотики для стимулювання зростання, ще з часу Другої світової війни, коли бракувало якісних кормів (Aarestrup, 2012).

Амфеніколи – група хімічних сполук з антибактеріальною активністю, до складу входять хлорамфенікол (ХАФ), тіамфенікол (ТАФ), флорфенікол (ФФ) та їх похідні. Амфеніколи використовують як в медицині, так і в ветеринарії. Перша сполука в цьому класі була виділена в1947 році з культуральної рідини *Streptomyces venezuealae*. Широке використання ХАФ в ветеринарії призвело до появи в продуктах харчування (м'ясо, молоко, мед, рибопродукти та ін.) цієї речовини, що спричиняє токсичний вплив на організм людини. У зв'язку з цим використання ХАФ було заборонено для лікування сільськогосподарських тварин та птиці в США (1984 р.) та в ЄС (1994 р.) (Pietro, Woźniak, Pasik, Cybulski, & Krasucka, 2014; Van, Yidana, Smooker, & Coloe, 2020). Флорфенікол (ФФ) є синтетичним протимікробним засобом широкого спектру дії та є одним з препаратів, що найбільш часто використовується в птахівництві, та був розроблений спеціально для ветеринарії. Він активний в більш низьких концентраціях, ніж тіамфенікол, з якого він отриманий та хлорамфенікол, що є його структурними аналогами (Pokrant, Riquelme, Maddaleno, San Martín, & Cornejo, 2018; Chang et al., 2009). Його спектр активності робить його ефективним проти кишкових бактерій, таких як *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris* и *Escherichia coli* (Anadón et al., 2008).

Нераціональне використання ветеринарних препаратів – введення недостатніх (субтерапевтичних) доз, збільшення інтервалів між введенням препарату, необґрунтоване подовження курсу лікування, порушення зоогігієнічних та санітарних норм не тільки знижує терапевтичну ефективність антимікробних препаратів, але і сприяє виникненню резистентних штамів патогенних мікроорганізмів (Cooper, Mccracken, Buurman, & Kennedy, 2008).

За даними ФАО, оцінки загального щорічного споживання антибіотиків в сільському господарстві в світі, через слабкість наглядових служб та недостатнього збору даних, коливаються в широких межах: від 63 тисяч тон до більш ніж 240 тисяч тон. Лише 42 країни світу збирають данні з використання антибіотиків в сільському господарстві (Antimicrobial resistance (AMR), 2017; Volk, Rednak, & Erjavec, 2017).

Застосування ветеринарних препаратів у тваринництві неминуче, оскільки вони мають важливе значення для лікування хвороб, профілактики захворювань, модифікації фізіологічних функцій, поліпшення росту та продуктивності, а також для забезпечення безпеки харчових продуктів. Однак нещодавні звіти показали, що використання ветеринарних препаратів у великих кількостях і

постійно може призвести до відкладення залишків антимікробних препаратів у м'язах та органах тварини (Falowo, & Akinmoladun, 2019; Ivanova, & Galkin, 2018).

Залишки протимікробних препаратів у сировині та продукції тваринного походження регламентуються такими нормативними документами ЄС: Регламентом Комісії (ЄС) №37/2010, Директивою Ради №96/23/ЄЕС, Постановою Ради (ЄС) 2377/90, Codex Alimentarius Commission (Commission Regulation (EU) No 37/2010, 2010; Council Directive 96/23/EC,1996; Council Regulation (EEC) No 2377/90, 1990).

Для флорфеніколу в м'язах тварин Європейський союз встановив максимально допустимі рівні (МДР): ВРХ, ДРХ – 200 мкг/кг, свині – 300мкг/кг, кури – 100 мкг/кг, інші види – 100 мкг/кг. Натомість Codex Alimentarius Commission взагалі не були встановлені максимально допустимі рівні для ФФ (Fahim et al., 2018).

Однак, оскільки ЄС встановив граничні межі залишків як для флорфеніколу, існує потреба контролювати харчові продукти тваринного походження щодо їх залишків (Fodey et al., 2013).

Враховуючи широкий спектр активності флорфеніколу, високий терапевтичний ефект в поєднанні з низькою токсичністю робить його важливим для використання в тваринництві (Zhang et al., 2008).

Тваринництво є важливою галуззю економіки, яка забезпечує населення продуктами харчування, переробну промисловість – сировиною, а також сприяє створенню необхідних державних резервів тваринницької продукції, інтенсивному використанню земельних ресурсів. До складу тваринництва входить скотарство, свинарство, птахівництво, вівчарство та менш поширені кролівництво, рибництво, бджільництво та інші (Volk, Rednak, & Erjavec, 2017).

Тривала присутність залишків флорфеніколу та флорфенікол-аміну в їстівних тканинах може зіграти важливу роль у безпеці харчових продуктів людини, оскільки сполуки можуть спричинити можливий ризик для здоров'я (Anadón et al., 2008).

Аналіз флорфеніколу можливо проводити за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (РХ) та рідинної хроматографії-мас-спектрометрії (РХ-МС) (Mistiri, Louati, Grissa, Kallel, & Safta, 2012).

Наразі в Україні проблемним питанням залишається визначення залишків антимікробних препаратів. Відомий метод імуноферментного аналізу (ELISA) вигідно вирізняється серед інших скринінгових методів високою чутливістю, специфічністю, простотою та швидкістю виконання, доступністю і стабільністю реагентів, можливістю комп'ютерної обробки результатів вимірювань та автоматизації етапів виконання аналізу, що забезпечує високу ефективність випробувань (Yanovych, Zasadna, Pazderskaya, & Kislova, 2014).

Мета роботи – провести валідацію методики з визначення залишків флорфеніколу в зразках м'язів різних видів тварин (ВРХ, свиней, курей, гусей, індиків, кролів та риби) методом імуноферментного аналізу.

Завдання дослідження: розробити схему розподілу зразків м'язів, визначити здатність виявлення (CCβ), рівень відсічення та відсоток повернення.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на базі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Матеріалом для дослідження слугував розчин флорфеніколу з концентрацією 1 мг/л, 40 контрольних зразки м'язів, що не містили цільового аналіту та 40 зразків м'язів, збагаченого стандартним розчином флорфеніколу до рівня цільової концентрації (ЦКС) –5,0 мкг/кг.

Визначення залишкових кількостей флорфеніколу проводили методом ELISA на спектрофотометрі (рідер) «Tecan Sunrise» (виробництво «Sunrise», Австрія) за допомогою тест-системи для конкурентного імуноферментного аналізу Kwinbon Biotech Florfenicol and Thiamphenicol (Cat.No.: KA12901H) (Китай). Стандартне відхилення (SD), відносне стандартне відхилення (RSD, %) і відсоток відтворення (Recovery, %) визначали за допомогою пакету «Статистика» Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення

Для здійснення валідації методу кількісного визначення флорфеніколу методом ІФА нами було розроблено схему розподілу зразків м'язів різних видів тварин (великої рогатої худоби, свиней, курей, гусей, індиків, кролів і риби).

Розподіл контрольних і збагачених флорфеніколом зразків м'язів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл зразків м'язів

Зразки	*1 день*						*2 день*			
	1 оператор				*2 оператор*		*1 оператор*		*2 оператор*	
холості	ВРХ	5	кролі	2	ВРХ	5	ВРХ	5	ВРХ	5
збагачені		5		2		5		5		5
холості	свині	2	індики	3	свині	1	риба	2	свині	2
збагачені		2		3		1		2		2
холості	риба	1	кури	3	кури	2	кролі	2	риба	2
збагачені		1		3		2		2		2
холості	кролі	1			гусі	3	індики	2	гуси	2
збагачені		1				3		2		2

Для отримання концентрації аналіту 5,0 мкг/кг добавку стандарту антибіотику розраховували таким чином: визначали кількість аналіту, що потрібно внести до зразка об'ємом 100 г за допомогою пропорції, де:

5,0 мкг аналіту в 1000 г зразка;

Х мкг аналіту в 100 г зразка.

У результаті було отримано:

$$x = \frac{5{,}0 \times 100}{1000} = 0{,}5 \text{ мкг}$$

Надалі визначали в якому об'ємі розведеного стандарту знаходиться визначена кількість аналіту, при цьому застосовують пропорцію де,

1000 мкг аналіту в 1000 мл;

0,5 мкг аналіту у Х мл.

У результаті було отримано:

$$x = \frac{0{,}5 \times 1000}{1000} = 0{,}5 \text{ мл}$$

Таким чином, для внесення на 100 г нульового зразка необхідно взяти 500 мкл розчину стандарту з концентрацією 1000 мкг/л.

Зразки з доданою добавкою необхідно ретельно перемішувати та досліджувати згідно з методичними вказівками (*Quantitative determination of florfenicol, 2018*).

Отримані результати дослідження наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Результати аналізу контрольних і збагачених флорфеніколом зразків м'язів ВРХ, мкг/кг

№ зразка	*Контрольні зразки*	*Збагачені зразки на рівні ЦКС 5,0 мкг/кг*
1	0,07	3,86
2	0,06	3,62
3	0,06	3,75
4	0,03	3,96
5	0,11	4,04
6	0,22	5,67
7	0,23	4,81
8	0,24	4,54
9	0,22	4,41
10	0,23	5,05
11	0,11	4,49
12	0,13	4,40
13	0,14	4,64
14	0,18	4,46
15	0,23	4,53
16	0,00	4,73
17	0,00	5,12
18	0,00	5,41
19	0,00	5,57
20	0,00	5,65
X середнє,	0,1	4,6
Стандартне відхилення	0,1	0,6
Відносне стандартне відхилення, %		13,5
Відтворення, %		93

Відповідно до наведених даних у таблиці 2 найбільше значення (найвища відповідь) для контрольних зразків становить 0,24 мкг/кг і найменше значення для збагачених зразків (найнижча відповідь) – 3,62 мкг/кг. За отриманими результатами жодна з відповідей для збагачених зразків не збігається з діапазоном відповідей для контрольних зразків. З цього випливає, що здатність виявлення (CCβ) за даним скринінг-методом менша або дорівнює 5,0 мкг/кг.

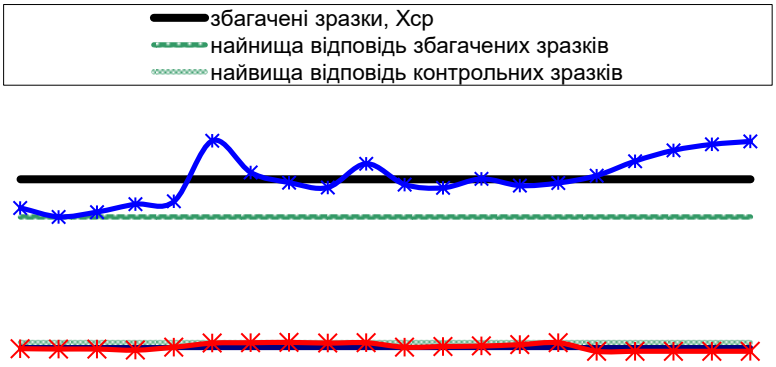

Рис. 1. Рівень відсічення за оцінки придатності методики кількісного визначення флорфеніколу у м'язах ВРХ

Рівень відсічення (рис. 1) цього тесту – 3,62 мкг/кг означає, що будь-який результат, вищий за цей рівень, можна вважати скринінг-позитивним, а отже перевищує здатність виявлення (CCβ) (β-помилка < 5 %).

У групі зразків, що збагачені на рівні 5 мкг/кг було отримане повернення на рівні 93 %, це відповідає даним, що зазначені виробником (100±30 %).

В зв'язку з тим що нормативна межа (CCβ) була встановлена для м'язів ВРХ, а метод буде застосовуватись для інших видів м'язів здатність виявлення необхідно визначити шляхом дослідження контрольних зразків інших видів тварин (свині, кури, гуси, індики, кролі та риба) та збагачених на рівні цільової концентрації скринінгу, що була використана для первинної матриці (5,0 мкг/кг). Отримані результати дослідження наведено у таблиці 3.

Таблиця 3

Результати аналізу контрольних і збагачених флорфеніколом зразків, мкг/кг

№ зразка	*Вид матриці*	*Контрольні зразки*	*Збагачені зразки на рівні ЦКС 5,0 мкг/кг*
1	м'язи свиней	0,00	3,72
2	м'язи свиней	0,04	3,92
3	м'язи свиней	0,28	5,89
4	м'язи свиней	0,00	5,41

№ зразка	*Вид матриці*	*Контрольні зразки*	*Збагачені зразки на рівні ЦКС 5,0 мкг/кг*
5	м'язи свиней	0,00	5,65
6	м'язи курей	0,34	4,25
7	м'язи курей	0,27	4,26
8	м'язи курей	0,31	4,37
9	м'язи курей	0,22	5,64
10	м'язи курей	0,25	4,24
11	м'язи гусей	0,35	4,67
12	м'язи гусей	0,34	4,31
13	м'язи гусей	0,30	4,26
14	м'язи гусей	0,00	5,82
15	м'язи гусей	0,00	5,78
16	м'язи індиків	0,03	3,95
17	м'язи індиків	0,04	4,00
18	м'язи індиків	0,31	4,21
19	м'язи індиків	0,12	4,31
20	м'язи індиків	0,15	4,68
21	м'язи риби	0,08	4,24
22	м'язи риби	0,13	4,71
23	м'язи риби	0,17	5,71
24	м'язи риби	0,09	5,12
25	м'язи риби	0,10	5,65
26	м'язи кролів	0,05	3,97
27	м'язи кролів	0,18	4,25
28	м'язи кролів	0,24	4,26
29	м'язи кролів	0,11	4,58
30	м'язи кролів	0,11	4,84
X середнє		0,2	4,6
Стандартне відхилення		0,1	0,7
Відносне стандартне відхилення, %			15,1
Відтворення, %			93

Відповідно до наведених даних у таблиці 2, межа відсічення для основної валідованої матриці м'язи ВРХ складає 3,62 мкг/кг. Згідно отриманих даних, зазначених в таблиці 3, жоден зразок не визначений, як скринінг-негативний. Всі збагачені зразки визначені вище рівня відсічення, таким чином метод може застосовуватись до зазначених вище матриць.

Відповідно до таблиці 3, у групі зразків м'язів, що збагачені на рівні 5 мкг/кг було отримане відтворення на рівні 93 %, це відповідає даним, що зазначені виробником (100 ± 30 %).

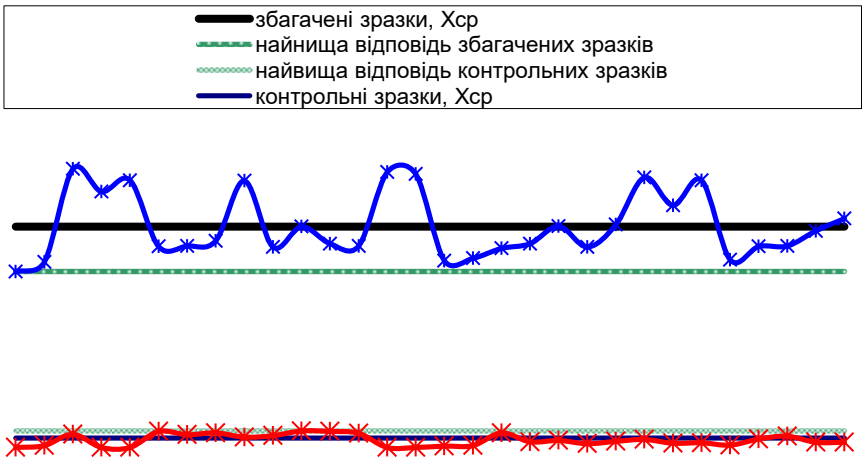

Рис. 2. Рівень відсічення за оцінки придатності методики кількісного визначення флорфеніколу у м'язах різних видів тварин.

На рисунку 2 зображено графічне подання технічного порогу та межі відсікання флорфеніколу у м'язах різних видів тварин.

Висновки

1. Розроблено схему розподілу зразків м'язів різних видів тварин (ВРХ, свиней, курей, гусей, індиків, кролів) і риби.

2. Встановлено валідаційні характеристики щодо визначення залишків флорфеніколу у зразках м'язів, такі як: здатність виявлення (CCβ) за даним скринінг-методом становить 5,0 мкг/кг, рівень відсічення – 3,62.

3. Найменший рівень визначення вмісту флорфеніколу, що може бути виявленим методом ELISA за допомогою тест-системи для імуноферментного аналізу Kwinbon Biotech Florfenicol and Thiamphenicol (Cat.No.: KA12901H) (Китай) становить 0,2 мкг/кг.

4. Відсоток повернення для збагачених зразків обох груп становить 93 %, що відповідає даним зазначеним виробником.

References

Aarestrup, F. (2012). Sustainable farming: Get pigs off antibiotics. *Nature*, 486, 465–466. DOI: 10.1038/486465a

Anadón, A., Martínez, M. A., Martínez, M., Ríos, A., Caballero, V., Ares, I., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2008). Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens. *J Agric Food Chem*., 56 (22), 11049-11056. DOI: 10.1021/jf802138y

Chang, S. K., Davis, J. L., Cheng, C. N., Shien, R. H., Hsieh, M. K., Koh, B. W., & Chou, C. C. (2009). Pharmacokinetics and tissue depletion of florfenicol in Leghorn and Taiwan Native chickens. *J. vet. Pharmacol. Therap*., 33, 471–479. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2009.01155.x

Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (Text with EEA relevance). *OJ,* L 15, 20.1.2010, 1–72**.** Retrieved from**:** https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010R0037

Cooper, K. M., Mccracken, R. J., Buurman, M., & Kennedy, D. G. (2008). Residues of nitrofuran antibiotic parent compounds and metabolites in eyes of broiler chickens. *Food Additives & Contaminants*: Part A, 25(5), 548–556. DOI: 10.1080/02652030701586657

Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *OJ*, L 125, 23.5.1996, 10. Retrieved from: http://data.europa.eu/eli/dir/1996/23/2013-07-01

Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *OJ*, L 224, 18.8.1990, 1–8. Retrieved from**:** http://data.europa.eu/eli/reg/1990/2377/oj

DNDILDVSE. (2018). *Quantitative determination of florfenicol and thiamphenicol using a test system for enzyme-linked immunosorbent assay Kwinbon Biotech Florfenicol and Thiamphenicol* (Cat.No.: KA12901H) method. recommendations. [in Ukrainian]

Fahim, A., Aslam, B., Mohsin, M., Raza, A., Faisal, M. N., & Hussain, A. (2018). Estimation of florfenicol residues in layer meat and egg samples using high performance liquid chromatography. *Pak Vet J*, 38(3), 329-332. DOI: 10.29261/pakvetj/2018.052

Falowo, A., & Akinmoladun, O. (2019). Veterinary Drug Residues in Meat and Meat Products: Occurrence, Detection and Implications. *Veterinary Pharmaceuticals*. DOI: 10.5772/intechopen.83616

FAO. (2017). Antimicrobial resistance (AMR): the loss of a major defence to the emerging challenge. *European Commission on Agriculture (ECA) 40th Session. Budapest, Hungary. 27-28 September 2017*. Retrieved from: http://www.fao.org/3/a-mu349e.pdf

Fodey, T. L., George, S.E., Traynor, I. M., Delahaut, P., Kennedy, D. G., Elliott, C. T., & Crooks, S. R. (2013). Approaches for the simultaneous detection of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine using immunochemical techniques. *J Immunol Methods*, 3393(1-2), 30-37. DOI: 10.1016/j.jim.2013.04.003

Ivanova, O., & Galkin, A. (2018). Comparative Characteristics of Physical, Chemical, and Biochemical Methods for Determining Nitrofuran Metabolites in Food. *Innovative Biosystems and Bioengi-neering*, 2 (1), 49–56. DOI: 10.20535/ibb.2018.2.1.127257

Mistiri, F., Louati, K., Grissa, O., Kallel, M., & Safta, F. (2012). Study of forced degradation behaviour of florfenicol by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 70(6), 333-347. DOI: 10.1016/j.pharma.2012.08.004

Pietro, W., Woźniak, A., Pasik, K., Cybulski, W., & Krasucka, D. (2014). Amphenicols stability in medicated feed – development and validation of liquid chromatography method. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, *58*(4), 621-629. DOI: 10.2478/bvip-2014-0095

Pokrant, E., Riquelme, R., Maddaleno, A., San Martín, B., & Cornejo, J. (2018). Residue Depletion of Florfenicol and Florfenicol Amine in Broiler Chicken Claws and a Comparison of Their Concentrations in Edible Tissues Using LC–MS/MS. *Molecules* , 23(9), 2211. DOI: 10.3390/molecules23092211

Van, T. T. H., Yidana, Z., Smooker, P. M., & Coloe, P. J. (2020). Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: Pluses and minuses. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 170–177. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.031

Volk, T., Rednak, M., & Erjavec, E. (2017). Agricultural policy developments in Western Balkan countries — regional synthesis. *Monitoring of agricultural policy developments in the Western Balkan countries,* 2-36. DOI: 10.2760/73968

Yanovych, D.V., Zasadna, Z. S., Pazderskaya, O. M., & Kislova, S. M. (2014). Application of enzyme-linked immunosorbent assay for screening residual amounts of veterinary drugs and contaminants in products of animal origin. *Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Biology and the State Research Control Institute of Veterinary Drugs and Feed Additives*, 15 (1), 249-255. Retrieved from**:** http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ntbibt_2014_15_1_51. [in Ukrainian]

Zhang, S., Liu, Z., Guo, X. Cheng, L., Wang, Z., & Shen, J. (2008). Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B,* 875(2), 399-404. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.09.035