

птицы при дерманисии. Проведено исследование относительно определения остаточных количеств инсектоакарицидной пудры Эктосан в мясе, паренхиматозных органах та яйцах птицы. Определены физико-химические показатели мяса и доказана его пищевая безопасность.

Ключевые слова: дерманисия, инсектоакарицидные средства, ветеринарно-санитарная оценка

ASSESSMENT OF QUALITY PRODUCTS AT SLAUGHTER POULTRY DERMANISIOSIS

Sumy national agrarian university, Sumy

L.V. Nagorna, lvn_10@mail.ru

Summary. In the article the qualities of products of slaughter of bird given in relation to determination are indicated at dermanisiosis. A study on the determination of residual amounts of powder insektoacaricid powder of Ektosan in meat, eggs parenchyma organs that bird. The physical and chemical indexes of meat are certain and his food safety is well-proven.

Key words: dermanisioz, insektoakaritsidnye, veterinary-sanitary assessment

УДК 619:614.31:637:577.2

РОЗРОБКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПЛР ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ШВИДКОЇ ДІАГНОСТИКИ ДЕЯКИХ ХАРЧОВИХ ПАТОГЕНІВ

Облап Р.В.^{1,2}, к.б.н., старший науковий співробітник,

Новак Н.Б.¹, к.с.-г.н., науковий співробітник,

Димань Т.М.², д.с.-г.н., професор, зав. кафедрою, roblap@hotmail.com

¹ДП «Укрметртестстандарт», м. Київ

²Білоцерківський національний аграрний університет, м. Біла Церква

Анотація. Розроблено та запропоновано до використання мультиплексну ПЛР тест-систему для діагностики *Listeria monocytogenes* та представників *Salmonella spp.* у продуктах харчування та сировині тваринного походження. При розробці тест-системи було використано TaqMan технологію методу полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (Real-Time PCR). Застосування тест-системи у практиці ветеринарно-санітарної експертизи дозволить значно скоротити час проведення досліджень порівняно з використанням традиційних методів аналізу бактеріальних патогенів. Діагностикум адоптований для проведення аналізів на приладах найбільш відомих виробників (BioRad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія) та буде значно дешевший зарубіжних аналогів.

Ключові слова: мультиплексна ПЛР, Real-Time PCR, *Listeria monocytogene*, *Salmonella spp.*, продукти харчування та сировина.

Актуальність проблеми. Безпека продуктів харчування і продовольчої сировини є однією з вирішальних складових економічної безпеки кожної держави та визначається спроможністю країни ефективно контролювати виробництво та ввезення безпечного та якісного продовольства на загальновізваних у світі засадах. Ця сфера діяльності у людському суспільстві має надзвичайно важливі гуманітарний, соціальний, економічний і політичний аспекти [1].

Харчові продукти не лише задовольняють природні потреби організму людини, але також є основною причиною виникнення та розповсюдження багатьох хвороб бактеріального та вірусного походження. Проблема поширення хвороб харчового походження, спричинених мікроорганізмами, стає дедалі актуальнішою. У промислово розвинутих країнах щороку кожний третій мешканець може потерпати від хвороб харчового походження. Таке поширення є результатом дії багатьох чинників, зокрема, інтенсивного впровадження нових технологій виробництва, створення нових видів харчових продуктів, використання нетрадиційної сировини та вакуумного пакування. Важливу проблему становить поява нових патогенних мікроорганізмів і патогенів, які раніше не асоціювались із харчовими продуктами – *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* DT104, *Escherichia coli* O157:H7, *Enterobacter sakazakii*, представники *Campylobacter*, *Yersinia* та ряду інших [2].

Сучасні вимоги до якості та безпеки продуктів харчування передбачають всебічну комплексну оцінку факторів, які діють не тільки на стан захисних функцій тварин, а й на здоров'я людини.

Найбільш серйозною небезпекою для здоров'я населення є мікробне забруднення продуктів збудниками інфекцій з харчовим шляхом передачі. Попередження харчових зоонозів вимагає розробки нових підходів та критеріїв в системі ветеринарно-санітарного контролю, а також впровадження високо чутливих та ефективних методів мікробіологічного та і молекулярно-генетичного аналізу [3].

В Україні державний нагляд і контроль за якістю та безпекою харчових продуктів покладено на Державну ветеринарну та фітосанітарну службу, яка у своїй діяльності керується Конституцією України та цілою низкою законодавчих актів [4]. Держветфітослужба України здійснює ветеринарно-санітарний контроль, який являє собою комплекс діагностичних і спеціальних досліджень з метою оцінки якості і безпечності сировини тваринного і рослинного походження, харчових продуктів, що призначаються для харчування людей, переробки і годівлі тварин.

Зрозуміло, що здійснення належного рівня контролю за якістю та безпекою харчових продуктів не можливе без наявності відповідних аналітичних методів аналізу. Тому розробці сучасних високоефективних методів детекції патогенних мікроорганізмів приділяється дуже велика увага.

Завдання дослідження. У зв'язку із цим метою цієї роботи була розробка та апробація вітчизняного діагностикуму на основі методу ПЛР у реальному часі (Real-Time PCR) для виявлення та ідентифікації *Listeria monocytogenes* та представників *Salmonella* spp. у продуктах харчування та харчовій сировині тваринного походження.

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом для виділення бактеріальної ДНК слугували типові штами родів *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* та *Escherichia*, а також харчові продукти, в яких було підтверджено наявність *Listeria monocytogenes* та представників *Salmonella* spp. мікробіологічними методами аналізу. Ізоляцію ДНК проводили за використання методу температурного лізису з наступним доочищенням на Silica-Spin колонках. Концентрацію та якість виділеної ДНК оцінювали методом спектрофотометрії за довжини хвилі $\lambda=260$ нм [5].

ПЛР-ампліфікацію в режимі реального часу проводили за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 2 мкл ДНК, 10 мМ Трис-НСІ (рН 8,3), 50 мМ КСІ, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ суміші, 10 пкМ кожного з праймерів, 5 пкМ зонду та 1 од. Таq-полімерази (Thermo Scientific, Литва). Температурний режим складався з початкової денатурації впродовж 3 хв за 94°C та наступних 40 циклів: денатурації – 20 с за 95 °С, відпалу праймерів – 60 с за 63 °С та синтезу – 30 с за 72 °С. Флуоресцентний сигнал вимірювали по завершенню стадії синтезу (72°C) у кожному циклі ампліфікації. Пороговий цикл (Ст) для кожного зразка визначали циклом, при якому кінетична крива флуоресценції перетинала граничну лінію. Базову лінію, що являє собою фоновий рівень флуоресценції, прилад розраховував автоматично.

Для виготовлення тест-систем використовували реагенти фірм «Sigma», «Fluka» (США), «Thermo Scientific» (Литва) та «Metabion» (Німеччина).

Результати дослідження. За оцінкою Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) сальмонельоз та лістеріоз відносяться до найбільш важливих широко розповсюджених інфекцій людини та сільськогосподарських тварин харчового походження. Збудником сальмонельозу людини є бактерії роду сальмонела (*Salmonella* spp.), в той час як захворювання на лістеріоз викликається факультативним анаеробом *Listeria monocytogenes* (рід *Listeria*) [6,7].

Розробці сучасних високочутливих методів діагностики харчових патогенів приділяється дуже велика увага. Не дивлячись на це, детекція лістерій та сальмонел представляє певні труднощі і потребує подальшого вивчення. Сучасна діагностика патогенних мікроорганізмів базується на бактеріологічних, серологічних та молекулярно-генетичних методах аналізу [8,9]. Традиційні методи детекції лістерій та сальмонел, засновані на культивуванні в поживних середовищах, мають високу чутливість і селективність, проте досить трудомісткі і займають багато часу. В останні роки широкого поширення в практиці лабораторної діагностики набули нові експрес-методи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR). Метод ПЛР виявився досить ефективним при діагностиці бактеріальних патогенів, внутрішньоклітинних паразитів, атипічних та здатних до довготривалої персистенції мікроорганізмів. Останні розробки в галузі ПЛР-технологій, зокрема ПЛР у реальному часі дають можливість значно прискорити час аналізу, зменшити його собівартість та трудомісткість, а завдяки його високій чутливості та вибірковості забезпечити винятковість визначення патогену в харчових продуктах, сировині та кормах [10].

З огляду на це, при розробці тест-системи нами було використано технологію *TaqMan* методу ПЛР у реальному часі [11]. Розроблена система є мультиплексною, оскільки уможлиблює проведення трьох незалежних реакцій в одній пробірці. Перша реакція направлена на виявлення видоспецифічної ділянки гену *hly* [12], що уможлиблює детектування *Listeria monocytogenes*, друга направлена на виявлення родоспецифічної ділянки гену *invA* [13], що уможлиблює детектування

представників *Salmonella spp.*, остання – на виявлення фрагмента гену бактеріальної 16S рРНК [14] як ендogenous контролю перебігу ПЛР. Перебіг кожної реакції відстежували за допомогою мічених зондів. Для виявлення послідовності *hly* використовували зонд мічений флуоресцентним барвником ROX та гасником флуоресценції BHQ2, для гену *invA* використовували зонд мічений барвником FAM та гасником BHQ1, гену 16S рРНК – зонд з барвником Cy5 та гасником BHQ3.

Проба розглядалася як позитивна на присутність *Listeria monocytogenes* тільки в тому випадку, якщо сигнал флуоресценції детектувався за двома каналами (ROX і Cy5), а значення Ст варіювало з 15 по 40 цикл, залежно від кількості матеріалу, взятого для виділення ДНК. Відповідно проба розглядалася як позитивна на присутність *Salmonella spp.* у випадку, якщо сигнал флуоресценції детектувався за каналами (FAM і Cy5), а значення Ст варіювало з 15 по 40 цикл. Зразки розглядалися як негативні, якщо сигнал детектувався лише за каналом Cy5 (ендогенний контроль), що свідчило про коректне проведення усіх стадій аналізу та відсутність інгібіторів ферментативної реакції. Якщо флуоресценція була відсутньою за всіма каналами, то проводили повторне дослідження даної проби зі збільшенням кількості вихідного матеріалу, взятого для виділення ДНК.

Оцінювання ефективності роботи тест-системи, а саме специфічності, чутливості, межі детектування, повторюваності та відтворюваності результатів аналізу проводили відповідно до вимог щодо розроблення ПЛР тест-систем з використанням референтних зразків.

Оптимізацію умов ампліфікації проводили за такими параметрами, як температура відпалу праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Оптимальна температура, за якої підібрані нами праймери найбільш ефективно працювали, становила 63°C. Найкращі результати було отримано за концентрації $MgCl_2$ 2,5 мМ. Проведення серії реакцій з різними комбінаціями концентрацій праймерів і зондів у межах від 2 до 20 пкМ уможливило досягнення мінімальної величини Ст і максимального значення ΔRn за постійної концентрації матриці-мішені. Оптимальне значення концентрації становило 10 пкМ для праймерів та 5 пкМ для зондів.

Визначення специфічності проводили шляхом тестування наступних мікроорганізмів: *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. agona*, *S. blegdam*, *S. dublin*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*. Перехресних реакцій при цьому виявлено не було (100% специфічність).

Межу чутливості розробленої тест-системи визначали шляхом приготування серії розведень бактеріальної ДНК (від 0,0001 до 100 нг геномної ДНК). Межа чутливості системи за геном *hly* становила 0,1 нг, за геном *invA* становила 0,01 нг, в той час як за геном 16S рРНК - 0,001 нг. Отримані нами результати виявились подібними до даних, описаних у літературних джерелах та отриманих за використання комерційних наборів.

Апробацію розробленої ПЛР тест-системи проводили за використання зразків харчової продукції, які попередньо були досліджені мікробіологічними методами аналізу щодо присутності представників *Listeria spp.* та *Salmonella spp.* В процесі тестування було досліджено 53 зразка продуктів харчування та сировини, з яких 9 було контаміновано *L. monocytogenes*, 3 - *L. ivanovii*, 4 - *S. typhimurium* та 18 не ідентифікованими представниками *Salmonella spp.* В інших 19 зразках мікробіологічними методами аналізу не було підтверджено присутності вищезгаданих патогенів.

Виявлення харчових патогенів за допомогою методу ПЛР-РЧ включало три етапи – неселективне збагачення досліджуваного зразку шляхом культивування у поживному середовищі, екстракцію ДНК із збагаченої культури та детекцію ДНК-мішені у автоматичному режимі. Неселективне збагачення зразків проводилося згідно МУК 4.2.2872-11 та дозволяло виключити хибно позитивні результати, які могли б мати місце при детекції ДНК не життєво здатних бактерій [15].

Результати порівняльних досліджень щодо присутності *L. monocytogenes* та представників *Salmonella spp.* в контамінованих зразках співпали в 100% випадках. В одному із зразків, який містив *L. ivanovii*, згідно мікробіологічного аналізу було виявлено також присутність *L. monocytogenes*. Що стосується 19 чистих зразків, згідно попередньо проведеного мікробіологічного аналізу, то в 2 випадках метод ПЛР-РЧ виявив присутність *Salmonella spp.* Таким чином отримані дані ще раз підтверджують доцільність застосування щонайменше двох методів аналізу, а також використання ПЛР-РЧ у випадку необхідності термінового отримання результату за рахунок значного (24-48 годин) скорочення часу дослідження.

Висновки

1. Відпрацьовано умови ампліфікації та запропоновано до використання мультиплексну тест-систему на основі методу ПЛР у режимі реального часу, яка дає змогу ідентифікувати *Listeria monocytogenes* та представників *Salmonella spp.* у продуктах харчування та сировині тваринного

походження;

2. Розроблена тест-система значно прискорює проведення аналізів щодо визначення патогенних мікроорганізмів та може бути запропонована до використання у практиці ветеринарно-санітарної експертизи;

3. Розроблений діагностикум адаптовано під прилади найбільш відомих виробників (BioRad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія) якими укомплектовано більшість випробувальних лабораторій України.

Литература

1. Маренич М. М. Контроль якості і безпека продуктів харчування в ЄС. Міжнародне законодавство в галузі харчового ланцюжка і потенціал України відповідності даним стандартам / Маренич М.М., Аранчій С.В., Марюха Н.С. – Полтава, 2009. – 42 с.
2. Димань Т.М. Безпека продовольчої сировини і харчових продуктів / Т.М. Димань, Т.Г. Мазур. – К.: ВЦ «Академія». – 2011. – 520 с.
3. Слободкін В.І. Деякі особливості розвитку епідемічного процесу за сучасних умов виробництва харчових продуктів / В.І. Слободкін, Н.Г. Шелковая, В.М. Левицька // Проблеми харчування. – 2006. – № 3. – С.9-16.
4. Указ президента України «Про затвердження Положення про Державну ветеринарну та фітосанітарну службу України» / Верховна Рада України офіційний веб-портал, <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/464/2011>
5. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві / Р.В. Облап, Н.Б. Новак, М.Д. Мельничук, Т.М. Димань, О.В. Дубін; за ред. Т.М. Димань. – Біла Церква: Видавництво БНАУ, 2010. – 68 с.
6. Pui C. F. Salmonella: A foodborne pathogen / C. F. Pui, W.C.Wong, L.C. Chai et al. // International Food Research Journal. – 2011. – №18. – Р. 465-473.
7. Бакулов И.А. Листерии и листериоз. / Под ред. И.А. Бакулова, Д.А. Васильева, Д.В. Колбасова и др. Ульяновск: УГСХА, 2008. – 168 с.
8. Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – Т. 2. – №10. – 2000. – С. 11-15.
9. Соколов Д.М. Ускоренные методы выявления бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах и сырье / Д.М. Соколов, М.С. Соколов // Вопросы питания. – 2013. – Том 82, № 1. – С. 33-40.
10. Postollec F. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology / F. Postollec, H. Falentin, S. Pavan et al. // Food Microbiology. – 2011. – 28(5). – Р. 1-14.
11. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др.; под редакцией Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009. – 223 с.
12. [Le Monnier A](#), [Abachin E](#), [Beretti J.L.](#), [Berche P.](#), [Kaval S](#). Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the hly gene. // [J. Clin. Microbiol.](#) – 2011. – 49(11). – Р. 3917-23.
13. Gonzalez-Escalona, N., Hammack, T.S., Russell, M., Jacobson, A.P., De Jesus, A.J., Brown, E.W. and Lampel, K.A. Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-based quantitative reverse transcriptase real-time PCR targeting invA mRNA // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – 75. – Р. 3714–3720.
14. [Nadkarni M.A.](#), [Martin F.E.](#), [Jacques N.A.](#), [Hunter N](#). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. // [Microbiology.](#) – 2002. – 148(Pt 1). – Р. 257-66.
15. МУК 4.2.2872-11. Методические указания "Методы выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путём передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией". – М., 2011. – 49 с.

РАЗРОБКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМИ
ДЛЯ БЫСТРОЙ ДИАГНОСТИКИ РЯДА ПИЩЕВЫХ ПАТОГЕНОВ
Облап Р.В.^{1,2}, Новак Н.Б.¹, Димань Т.Н.², roblap@hotmail.com

¹ГП «Укрметртестстандарт», г. Киев

²Белоцерковский национальный аграрный университет, г. Белая Церковь

Аннотация. Разработана и предложена к использованию мультиплексная ПЦР тест-система для диагностики *Listeria monocytogenes* и представителей *Salmonella spp.* в продуктах питания и сырье животного происхождения. При разработке тест-системы была использована *TaqMan* технологию методу полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR). Применение тест-системы в практике ветеринарно-санитарной экспертизы позволит значительно

сократить время проведения исследований по сравнению с использованием традиционных методов анализа бактериальных патогенов. Система адаптирована для проведения анализов на приборах наиболее известных производителей (BioRad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технология) и будет значительно дешевле зарубежных аналогов.

Ключевые слова: мультиплексная ПЦР, Real-Time PCR, *Listeria monocytogene*, *Salmonella spp.*, продукты питания и сырье.

MULTIPLEX PCR TEST-SYSTEM DESIGN FOR QUICK DIAGNOSTIC OF DEFINITE FOOD PATHOGENES

Oblap R.^{1,2}, Novak N.¹, Dyman T², roblap@hotmail.com,¹ SE «Ukrmetrteststandart», Kyiv

² National Agricultural University of Bila Cerkva, Bila Cerkva

Summary. Multiplex PCR test-system for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* diagnostic in food products and raw animal material has been designed and proposed for using. *TagMan* technology was used during Real-Time PCR method designing. Test-system application in veterinary-sanitary practice will allow to reduce time of analysis performing significantly compared to traditional methods of bacterial pathogenes analysis. Diagnosticum is adapted to most reputed equipment (BioRad, Applied Biosystems, Corbett Research, Syntol, DNA-technology) and it will be not such expensive as foreign counterpart.

Key words: multiplex PCR, Real-Time PCR, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, food products and raw material.

УДК: 619: 639.2.09; 639.3.09

ЗМІНИ В АМІНОКИСЛОТНОМУ СКЛАДІ М'ЯСА КОРОПА ТА ТОВСТОЛОБА ЗА ГОСТРОГО ТА ХРОНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ АЕРОМОНОЗУ

Петров Р.В., к. вет. н., доцент³

romanpetrov1978@mail.ru

Сумський національний аграрний університет, м. Суми

Анотація. В даній статті наведені дані щодо показників м'яса коропа при гострому та хронічному перебігу аеромонозу. В порівняльному аспекті наведені зміни амінокислотного складу м'яса риби при різних рівнях ураження. В результаті досліджень виявлялись значні відмінності в кількості замісних та незамінних амінокислот у уражених аеромонозом і здорових коропів та білих товстолобиків. Зміни в амінокислотному складі свідчать про глибокі зміни в обміні речовин у уражених аеромонозом риб.

Ключові слова: риба, короп, товстолоб, якість, безпека, аеромоноз, амінокислоти.

Актуальність проблеми. Прісноводна риба є цінним продуктом харчування і є джерелом потрібних повноцінних білків, вітамінів, мінеральних елементів та інших речовин, що необхідно для людського організму. Для нормального забезпечення організму вище згаданими речовинами, людина повинна споживати не менш 20 кг риби та рибопродуктів на рік [1, 5, 6].

Амінокислоти, що входять до складу м'язової тканини риб, надають високу харчову цінність рибним продуктам і спільно з однойменними компонентами, що містяться в продуктах тваринного і рослинного походження, забезпечують повноцінне харчування людини.

Риба та її продукти посідають істотне місце в харчуванні людини. За вмістом основних поживних речовин, незамінних амінокислот, ненасичених жирних кислот, вітамінів та мінеральних речовин, а також за легкою перетравністю і засвоюваністю м'ясо риби можна віднести до дієтичного продукту. Воно містить 16-21 % легко перетравного білка, який за біологічною цінністю не тільки не поступається білку теплокровних тварин, а й за деякими показниками перевершує його. Вміст жиру у найбільш поширеної прісноводної риби коропа становить 9-11 % [6].

³ Науковий консультант – професор, д. вет. н. Т.І. Фотіна