11. Ellin DoyleM., Faye A., Hartmann, Amy C., Lee Wong. Whit Paper on sources of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Other Methicillin-Resistant Staphylococcus: Implication for Oua Food Supply. https://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/FRI_Brief_MRSA_FoodSupply_Feb 2011.pdf

УДК 619:616.98:579.842.14

ГАРКАВЕНКО Т.О., канд. вет. наук, ст. наук. сп.,
e-mail: bac@vetlabresearch.gov.ua
МЕХ Н.Я., e-mail: bac@vetlabresearch.gov.ua
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
СКОРОБРИЩУК К.А., e-mail: vetreg@mail.ru
Черкаська регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини

АЛЬТЕРНАТИВНИЙ ЕКСПРЕС-МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ САЛЬМОНЕЛ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ ТА КОРМАХ МЕТОДОМ ПЛР ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ СИСТЕМИ ТА НАБОРІВ РЕАГЕНТІВ BAX®

Проаналізовано виявлення мікроорганізмів роду Salmonella у харчових продуктах та кормах еталонним аналітичним методом та альтернативним методом ПЛР із використанням системи та наборів реагентів BAX®. Обґрунтовано необхідність упровадження експрес-методу в лабораторну практику державних лабораторій ветеринарної медицини України.

Ключові слова: *виявлення, експрес-метод, метод ПЛР, Salmonella, BAX®.*

Вступ. Сальмонельоз розглядається як одне з найбільш небезпечних захворювань у птахівництві всіх країн світу. Він викликає загибель птиці, характеризується бактеріоносійством і є причиною виникнення токсикоінфекцій у людей. Одним з основних джерел збудника є хвора птиця, яйця та інші продукти птахівництва [1]. Виникнення хвороби пов'язане з вживанням в їжу продуктів, контамінованих сальмонелами.

Беручи до уваги поліетіологічність захворювання, різноманітність клінічних форм, безсимптомне носійство, а також те, що контаміновані сальмонелою продукти і корми не мають органолептичних змін, проблема як і раніше залишається актуальною [2]. За складністю діагностики, профілактики та лікування сальмонельоз не має собі рівних [3]. Збудник може бути присутнім в досліджуваних об'єктах в незначній кількості і переважно в поєднанні з іншою мікрофлорою, що також ускладнює його виділення класичними бактеріологічними методами і, як наслідок, продукція надходить у продаж без обмежень [4].

Мікробіологія сьогодні характеризується розвитком нових ефективних діагностичних технологій, що засновані на глибоких

фундаментальних знаннях біології мікроорганізмів і передових інженерно-технічних рішеннях задач автоматизації та підвищення ефективності аналізу. У зв’язку з цим виникає необхідність у вдосконаленні наявних методів, створенні нових експрес-методів діагностики та індикації, спрямованих на скорочення часу проведення аналізу, його спрощення при одночасному збільшенні надійності та легкості інтерпретації отриманих результатів при високій чутливості та специфічності [5].

Класичним методом виявлення збудника сальмонельозу в харчових продуктах, продовольчій сировині, кормах та об’єктах зовнішнього середовища є бактеріологічний метод (посів досліджуваного матеріалу на поживні середовища збагачення, виділення чистої культури сальмонели та її ідентифікація). Істотним недоліком класичного методу виявлення сальмонел є тривалість досліджень, для отримання негативного результату (відсутність сальмонели у 25 г зразку) необхідно мінімум 3–4 доби, у разі одержання росту підозрілих колоній ідентифікація продовжується до 6–7 діб.

Тож постала проблема пошуку альтернативних методів випробувань зразків, які б дозволили отримувати достовірні результати за більш короткий термін [6].

Мета роботи – провести порівняльні дослідження по виявленню сальмонели у продуктах харчування та кормах класичним (еталонним) та альтернативним методом ПЛР із використанням системи та наборів реагентів BAX®; визначити перспективу використання експрес-методу у практичній діяльності державних лабораторій ветеринарної медицини.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження виконували на базі бактеріологічного відділу Черкаської РДЛВМ. Виявлення сальмонел із харчових продуктів та кормів проводили еталонним класичним бактеріологічним (ДСТУ ISO 6579) та альтернативним методом (метод ПЛР із використанням системи та наборів реагентів BAX®). Цей експрес-метод пройшов валідацію та визнаний такими організаціями як AOAC (Міжнародна Асоціація аналітичних співтовариств), AFNOR Approval (французька асоціація по стандартизації, аналогічна за призначенням ANSI). Погоджений міністерством сільського господарства США, Датською ветеринарною та продовольчою адміністрацією, Японським міністерством охорони здоров'я, праці та соціального забезпечення, Народною Республікою Китай. У Бразилії цей метод являється еталонним для визначення сальмонел та лістерій. В Україні ж метод ПЛР із використанням системи та наборів реагентів BAX® лише починає впроваджуватись в лабораторну практику.

Для дослідження використовували матриці: риба свіжоморожена, м’ясо свіжоморожене, м’ясо з прянощами, молочні продукти (сир твердий), яйця курячі, комбікорм.

Матриці досліджували у вихідному стані (з нульовим рівнем зараження), контаміновані *Enterobacter aerogenes 10006* та *Proteus vulgaris НХ 19 №222* (для визначення специфічності методу) а також *Salmonella typhimurium* 144 та *Salmonella adabraka 1* в низькій (10^1–10^2 КУО/см^3) та високій (10^6 КУО/см^3) концентраціях (з метою визначення чутливості

методу), повторюючи кожне дослідження п’ять разів. Варіанти контамінації зразків наведені у табл. 1.

При проведенні досліджень використовували наступне обладнання та матеріали: стерилізатор, автоклави, ламінарні шафи, аналітичні ваги, водяну баню, pH-метр, ГОСТовані піпетки, лабораторні пальники, «Vortex», багміксер, пакети для гомогенізації, термостати, бактеріологічні петлі, автоматизовану систему BAX®. Статистичну обробку даних проводили згідно ISO 16140.

Таблиця 1

Варіанти контамінації зразків для проведення валідації щодо виявлення сальмонел методом ПЛР із використанням системи та наборів реагентів BAX®, n = 5

Матриця	Чистий зразок		Контамінація культурою нецільового м/о, КУО/см^3				Контамінація культурою цільового м/о, КУО/см^3			
			10^1–10^2		10^6		10^1–10^2		10^6	
	К	А	К	А	К	А	К	А	К	А
Риба свіжоморожена	–//–		*Enterobacter aerogenes 10006*				*Salmonella typhimurium* 144			
			Proteus vulgaris HX 19 №222				*Salmonella adabraka 1*			
	К	А	К	А	К	А	К	А	К	А
М’ясо свіжоморожене	–//–		*Enterobacter aerogenes 10006*				*Salmonella typhimurium* 144			
			Proteus vulgaris HX 19 №222				*Salmonella adabraka 1*			
	К	А	К	А	К	А	К	А	К	А
М’ясо з прянощами	–//–		*Enterobacter aerogenes 10006*				*Salmonella typhimurium* 144			
			Proteus vulgaris HX 19 №222				*Salmonella adabraka 1*			
	К	А	К	А	К	А	К	А	К	А
Сир твердий	–//–		*Enterobacter aerogenes 10006*				*Salmonella typhimurium* 144			
			Proteus vulgaris HX 19 №222				*Salmonella adabraka 1*			
	К	А	К	А	К	А	К	А	К	А
Яйця курячі	–//–		*Enterobacter aerogenes 10006*				*Salmonella typhimurium* 144			
			Proteus vulgaris HX 19 №222				*Salmonella adabraka 1*			
	К	А	К	А	К	А	К	А	К	А
Комбікорм	–//–		*Enterobacter aerogenes 10006*				*Salmonella typhimurium* 144			
			Proteus vulgaris HX 19 №222				*Salmonella adabraka 1*			

Примітка: А – альтернативний метод, **К** – класичний метод

Таблетована ПЛР-суміш наборів BAX® із реєстрацією продуктів ампліфікації у режимі реального часу містить групу специфічних мішеней, зонди, мічені барвником. За гібридизації з послідовністю, що ампліфікується у ході ПЛР, зонд руйнується і відбувається від’єднання флуорофору та гасителю. Барвник зв’язується з дволанцюговою ДНК та дає сигнал флуоресценції під дією світла. Після ампліфікації система BAX® починає реєструвати сигнал флуоресценції. Сигнал флуоресценції підсилюється пропорційно числу накопичення ампліконів. Протягом реєстрації температура зразка підвищується до точки денатурації ниток ДНК, при

цьому вивільняється барвник, і знижується сигнал флуоресценції. Зміни сигналу флуоресценції зображуються у вигляді кривих залежності температури, а саме кривої плавлення, яка інтерпретується програмним забезпеченням системи BAX® як позитивний або негативний результат.

Цей метод скорочує тривалість визначення сальмонел для негативних проб до 1–2 діб (залежно від виду продукту) і задовільняє всі вимоги, що висуваються до альтернативних методів згідно ISO 16140.

Результати досліджень та їх обговорення. Технологія BAX® спрощує проведення аналізу та дозволяє швидко й легко виявити сальмонели із середовищ збагачення за використання стандартних методик посіву з наступним використанням методу ПЛР із застосуванням системи та наборів реагентів BAX®.

Першим етапом дослідження є посів дослідного матеріалу (зразка) на середовища збагачення, що є ідентичним першому етапу класичного бактеріологічного методу. Далі зразки відправляють на аналіз методом ПЛР.

Результати проведених досліджень наведені у табл. 2.

Позитивний результат, отриманий із використанням системи BAX®, потребує підтвердження класичними бактеріологічними методами із виділенням чистої культури.

Відносна точність при виявленні сальмонел методом ПЛР із використанням системи та наборів реагентів BAX® становила 100%.

Як результат всіх підтверджених негативних результатів та відсутності хибно негативних відносна специфічність становила 100%.

Як результат всіх підтверджених позитивних результатів та відсутності хибно позитивних відносна чутливість також становила 100%.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Виявлення бактерій роду *Salmonella* методом ПЛР із використанням системи та наборів реагентів BAX® у харчових продуктах та кормах скорочує тривалість дослідження до 1–2 діб при одержанні негативного результату порівняно з традиційним методом.

2. Сучасні технології, що застосовуються у системі BAX®, дозволяють з високою чутливістю та специфічністю проводити ідентифікацію патогенних мікроорганізмів, у тому числі *Salmonella*, у харчових продуктах та продовольчій сировині, мінімізуючи людський фактор, виключаючи можливість перехресної контамінації проб.

Таблиця 2

Отримані результати по виявленню сальмонели у досліджуваних матрицях

Рівень контамінації			Загальна кількість зразків	Кількість оброблених результатів	Кількість негативних результатів		Кількість позитивних результатів	
					К	А	К	А
Чистий зразок		**0**	**6**	**12**	**6**	**6**	**0**	**0**
Контаміновані нецільовою культурою м/о	10^1–10^2	*Enterobacter aerogenes 10006*	12	12	6	6	0	0
		Proteus vulgaris HX 19 №222		12	6	6	0	0
	10^6	*Enterobacter aerogenes 10006*	12	12	6	6	0	0
		Proteus vulgaris HX 19 №222		12	6	6	0	0
Контаміновані цільовою культурою м/о	10^1–10^2	*Salmonella typhimurium* 144	12	12	0	0	6	6
		Salmonella adabraka 1		12	0	0	6	6
	10^6	*Salmonella typhimurium* 144	12	12	0	0	6	6
		Salmonella adabraka 1		12	0	0	6	6

Примітка: А – альтернативний метод, **К** – класичний метод.

3. Альтернативний метод відповідає спеціалізованим параметрам (чутливість, повторюваність, відтворюваність та специфічність становлять 100%), тому є придатним до використання в повсякденній роботі державних лабораторій ветеринарної медицини України як скринінговий метод дослідження на наявність сальмонел.

4. При отриманні позитивного результату дослідження за допомогою системи BAX® слід проводити підтвердження класичним бактеріологічним методом із виділенням чистої культури сальмонели.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шиленко И.В. Отечественный имунохроматографический тест для выявления сальмонелл различных серогруп / И.В. Шиленко, С.П. Ярков, А.Б. Кононенко, А.В. Артемов, А.М. Смирнов // Веткорм. – 2011. – №4. С.12-13.

2. Лаптєв Ю.О. Біобезпека та захист птиці від сальмонельозу / Ю.О. Лаптєв, П.М. Яблонський // Тваринництво сьогодні – 2012 – №6. С. 60-61.

3. Алескеров З.А. Сальмонеллез овец в Азербайджане / З.А. Алескеров // Ветеринария – 2008 – №8. С. 23-26.

4. Стрелков А.А. Влияние иммуномагнитосорбции на морфологию популяции сальмонелл / А.А. Стрелков // Ветеринария – 2010 – № 9. С. 40- 42.

5. Алиева Е.В. Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммунодиагностических препаратов для выявления возбудителей листериоза и кампилобактериоза: автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра. мед. наук: 03.00.07/ Е.В. Алиева. – Москва, 2008. – 19 с.

6. Олійник Л. Фаготипування при діагностиці сальмонельозу / Л. Олійник // Ветеринарна медицина України – 2004 – №1 – С.14-16.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛЫ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И КОРМАХ МЕТОДОМ ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ И НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ BAX® / Гаркавенко Т.А., Мех Н.Я., Скоробрищук К.А.

Проанализированы эталонный аналитический метод исследования и альтернативный метод ПЦР с использованием системы и наборов реагентов BAX® для обнаружения микроорганизмов рода Salmonella в пищевых продуктах и кормах. Обоснована необходимость внедрения экспресс-метода в лабораторную практику государственных лабораторий ветеринарной медицины Украины.

Ключевые слова: *выявление, экспресс-метод, метод ПЦР, Salmonella, BAX®.*

ALTERNATIVE METHOD OF RAPID DETECTION OF SALMONELLA IN FOOD AND FEED BY PCR USING THE BAX® SYSTEM AND REAGENT KIT / Garkavenko T., Mekh N., Skorobrischuk K.

Introduction. *The classic method for detection of the pathogen Salmonella in foods, raw food and environmental objects are bacteriological method (seeding test material for culture media enrichment, separation of pure cultures of Salmonella and its identification). A major shortcoming of the classical method of detecting Salmonella is the duration of studies. Alternative methods can significantly reduce the time to detect these bacteria.*

The goal of the work *was to conduct a comparative study on detection of Salmonella from food and feed by classic (reference) and alternative PCR using BAX® systems and kits; define the perspective of rapid method in practice state veterinary medicine laboratories.*

Materials and methods. *The study was conducted at the Cherkasy RDLVM. Detection of Salmonella in food and feed conducted using classical bacteriological (ISO 6579) and alternative methods (using PCR systems and kits BAX®).*

For research we used matrix: frozen meat with spices, dairy products (cheese), eggs, feed.

Matrix examined in the initial state (zero-infection), contaminated Enterobacter aerogenes 10006 and Proteus vulgaris NH 19 №222 (to determine the specificity of the method) and Salmonella typhimurium and Salmonella adabraka 144 1 in low (101–102 CFU/cm^3) and high (106 CFU/cm^3) concentrations (to determine the sensitivity of the method), repeating five times each test.

Results of research and discussion. *Classical microbiological test methods designed to detect salmonella takes a very long time. They include the following steps: enrichment in nonselective liquid medium selective enrichment in liquid media, sat on the hard differential diagnostic environment, the allocation of net culture and its identification. For negative results on the food or animal feed (no salmonella in 25 g sample) should be at least 4 days in case of obtaining the growth of colonies suspicious identification lasts 6–7 days.*

So, we faced with the problem of finding alternative methods of testing samples that would allow to get reliable results in a shorter time.

This method reduces the determination of Salmonella negative for samples to 1–2 days (depending on product) and meets all the requirements that apply to alternative methods according to ISO 16140.

Conclusions and prospects for further research:

1. Identification of bacteria of the genus Salmonella by PCR using BAX® systems and kits in food and feed research reduces time of test up to 1–2 days upon reception of a negative result compared with the traditional method.

2. Modern technologies used in the BAX® system allow to identify pathogens with high sensitivity and specificity, including Salmonella, in food and foodstuffs, minimizing the human factor, eliminating the possibility of cross contamination of samples.

3. An alternative method meets the specialized parameters (sensitivity, repeatability, reproducibility and specificity – 100%), so it is suitable for use in routine work of bacteriological department of state veterinary medicine laboratories of Ukraine as a screening method for studying the presence of Salmonella.

4. In case of positive result using the BAX® system it is necessary to prove it with classical microbiological methods with next isolation of the pathogen culture.

References

1. Shilenko, I.V., Jarkov, S.P., & Kononenko A.B., et al. (2011). Otechestvennyj imunohromatograficheskij test dlja vyjavlenija sal'monell razlichnyh serogrup [Otechestvennyy ymunohromatohrafycheskyy test identify salmonellas different serogroup]. Vetkorm. – Vetkorm, 4, 12-13 [in Russian].

2. Laptiev, Ju.O., & Jablons'kij P.M. (2012). Biobezpeka ta zakhyst ptytsi vid sal'monel'ozu [Biosafety and protecting birds from Salmonella]. Tvarynnytstvo s'ogodni – Livestock Today, 6, 60-61 [in Ukrainian].

3. Aleskerov, Z.A. (2008). Sal'monellez ovets v Azerbajdzhane [Salmonellez sheep in Azerbaijan]. Veterinariia – Veterynaryya, 8, 23-26 [in Russian].

4. Strelkov, A.A. (2010). Vlijanie immunomagnitosorbcyi na morfologiiu populiacyi sal'monell [Effect on ymmunomahnytosorbtsyy morfolohyyu populyatsyy salmonellas]. Veterinariia – Veterynaryya, 9, 40-42. [in Russian].

5. Alieva, E.V. (2008). Razrabotka laboratornyh ekspress-metodov i tekhnologii proizvodstva immunodiagnosticheskikh preparatov dlia vyiavleniia vozbuditelei listerioza i kampilobakterioza [Development laboratornyh express-production methods and technologies for drugs ymmunodyahnostycheskyh Identify pathogen listeriosis and kampylobakteryoza]. Extended abstract of Doctor’s thesis. Moskva [in Russian].

6. Olijnyk, L. (2004). Fahotypuvannia pry diahnostytsi sal'monel'ozu [Fahotypuvannya the diagnosis of salmonellosis]. Veterynarna medytsyna Ukrainy – Veterinary Medicine Ukraine, 1, 14-16 [in Ukrainian].