



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111266** (13) **C2**

(51) МПК (2016.01)

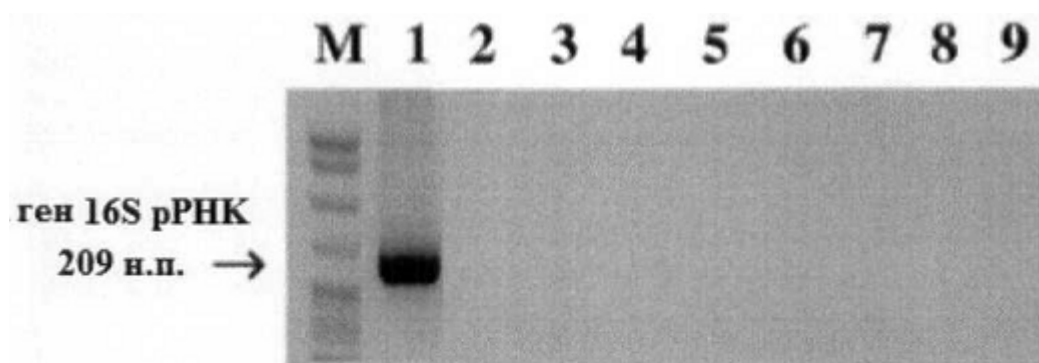
**C12N 15/11** (2006.01)**C12Q 1/04** (2006.01)**C12Q 1/68** (2006.01)**C12R 1/145** (2006.01)**C12N 1/00**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 09534</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Сава Василь Михайлович (UA),</b> <b>Пилипенко Людмила Миколаївна (UA),</b> <b>Пилипенко Інна Василівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>29.08.2014</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>11.04.2016</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.03.2016, Бюл.№ 5</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Сава Василь Михайлович,</b> вул. Академіка Лазаренка, 36, кв. 3, м. Львів, 79026 (UA), <b>Пилипенко Людмила Миколаївна,</b> вул. Канатна, 130/А, кв. 4, м. Одеса, 65039 (UA), <b>Пилипенко Інна Василівна,</b> Фонтанська дорога, 19, кв. 3, м. Одеса, 65009 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.04.2016, Бюл.№ 7</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Щербина Микола Андрійович, реєстр. №18</b>
	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Wang RF et al., A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of <i>Clostridium perfringens</i> in food. Mol. Cell Probes. 1994 Apr; Vol. 8, no. 2, page 131-137 Pcy Woo et al., <i>Clostridium</i> bacteraemia characterised by 16 S ribosomal RNA gene sequencing. J clin.Pathol., 2005, Vol. 58, pages 301-307 Augustynowicz E., et al. Detection of enterotoxigenic <i>Clostridium perfringens</i> with a duplex PCR. J Med. Microbiol., 2002, Vol.51, page 169-172 Chon JW et al., Development of real-time PCR for the detection of <i>Clostridium perfringens</i> in meats and vegetables. J Microbiol Biotechnol. 2012 Apr, Vol. 22, no. 4, page 530-534 Stackebrandt E. et al., Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol. 2002 May; Vol. 52 (Pt 3), page 1043-1047 CN 101892299 A, 24.11.2010 (реферат)

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ****(57) Реферат:**

Винахід належить до способу визначення *Clostridium perfringens* в харчових продуктах, відповідно до якого з основної біомаси зразка виділяють клітини мікроорганізмів, проводять їх лізис в присутності інгібітора ДНКаз і піддають ПЛР-аналізу з використанням пари праймерів, специфічних до гена 16S рибосомальної РНК *Clostridium perfringens*.

UA 111266 C2



Фіг. 1

Результати ампліфікації гена 16S рРНК *C. perfringens* (209 н.п.) методом ПЛР у порівнянні з ПЛР геномної ДНК ( $5 \times 10^5$  екземплярів) виділеної з інших бактерій:

- Смуга 1-*Clostridium perfringens*
- Смуга 2-*Clostridium butyricum*
- Смуга 3-*Clostridium sporogenes*
- Смуга 4-*Lactobacillus plantarum*
- Смуга 5-*Bacillus licheniformis* sp.
- Смуга 6-*Bacillus subtilis*
- Смуга 7-*Proteus vulgaris*
- Смуга 8-*Bifidobacterium adolescentis*
- Смуга 9-*Bacillus cereus*
- Смуга М містить ДНК маркери.

Винахід належить до харчової промисловості, зокрема до способу визначення санітарної безпеки харчових продуктів шляхом виявлення в них мезофільного мікроорганізму роду *Clostridium*, конкретно *Clostridium perfringens*.

*Clostridium perfringens* є збудником харчових отруєнь, його наявність в їжі є одним з факторів ризику утворення мікробіологічних токсинів в харчових продуктах. Безпека харчових продуктів повинна відповідати гігієнічним вимогам безпеки і харчової цінності харчових продуктів, відображених в санітарно-епідеміологічних правилах і нормативах СанПіН 2.3.2.1078-01 (СанПіН 2.3.2.1078-01 Гігієнічні вимоги безпеки і харчової цінності харчових продуктів. Санітарно-епідеміологіческие правила і нормативи. СанПіН 2.3.2.1078-01, введені з 01.09.2002 р.), а також в єдиних санітарно-епідеміологічних і гігієнічних вимогах до товарів, що підлягають санітарно-епідеміологічному нагляду (контролю). Відповідно до цих вимог в різних класифікаційних групах харчових продуктів нормуються такі показники, як вміст сульфітрeredуруючих клостридій, вміст мезофільних і термофільних клостридій в масі зразка. Такі форми контролю пов'язані з ризиками присутності в зразках харчової продукції *Clostridium perfringens*, проте, видове виявлення цього мікроорганізму стандартними методами дуже тривале, що є неприйнятним особливо для тих видів харчових продуктів, які швидко псуються. Ідентифікація родової приналежності *Clostridium* стандартними методами має тривалість інкубації посівів до 72 годин (ГОСТ 29185-91 Продукти харчові. Методи виявлення та визначення кількості сульфітрeredууючих клостридій), подальше підтвердження мікроорганізмів, що вирости, за культуральними, морфологічними та біохімічними ознаками до групи сульфітрeredууючих клостридій, однак цей метод дозволяє лише умовно дати оцінку безпеки досліджуваного харчового продукту.

Швидка ідентифікація і виявлення *Clostridium perfringens* є важливою складовою безпеки продукту.

Відомий спосіб визначення санітарної безпеки продуктів шляхом виявлення в них санітарно-показових бактерій *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* і стартових культур родів *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Pediosoccus* в м'ясних продуктах, що включає приготування середовища, збагачення згідно з прописом, контроль рН, стерилізацію, виявлення санітарно-показових бактерій і стартових культур в м'ясних продуктах і їх ідентифікацію. Середовище збагачення, згідно з прописом, готують наступним чином. У 950 мл дистильованої води розчиняють 10 г пептону, 5 г м'ясного екстракту, 5 г дріжджового екстракту, 1 г твіну-80, 3 г натрію фосфорнокислого, 0,10 г магнію сірчаноокислого, 0,01 г заліза сірчаноокислого. Середовище стерилізують при 1,1 атм протягом 15 хв., далі в 50 мл дистильованої води розчиняють 20 г глюкози, отриманий 40 %-ий розчин глюкози стерилізують при 0,5 атм протягом 20 хв., потім в асептичних умовах додають до середовища і перемішують. Для виділення санітарно-показових бактерій і стартових культур в стерильних умовах відбирають 25 г зразка м'ясного продукту і поміщають в колбу, що містить 250 мл середовища, інкубують при 37 °С протягом 16 годин, після чого бактерії відокремлюють від середовища центрифугуванням при 4000 об./хв., відмивають від залишків живильного середовища фізіологічним розчином, і знову центрифугують при 4000 об./хв. З отриманих бактеріальних клітин виділяють геномну ДНК і ідентифікують бактерії: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* за допомогою ПЛР-аналізу з електрофоретичною схемою детекції (див. патент РФ № 2460801).

Однак наведений спосіб не дозволяє визначити санітарну безпеку харчових продуктів шляхом виявлення в них анаеробних мікроорганізмів *Clostridium perfringens*.

Відомий спосіб визначення санітарної безпеки харчових продуктів шляхом виявлення в них мезофільних клостридій - збудників бомбажа, при контролюванні промислової стерильності консервів відповідно до ГОСТ 30425-97 (ГОСТ 30425-97 Консерви. Метод визначення промислової стерильності. Персіанова І.П. та ін. Збірник методичних вказівок щодо виконання лабораторних робіт із засвоєння методик контролювання мікробіологічних показників у консервному виробництві. Одеса. Видавництво "Пальміра", 2011р., с. 196-212).

Спосіб визначення включає наступні етапи:

- приготування живильного середовища для виявлення облигатних анаеробів;

- відбір проби;

- засів проби;

- витримка засіяної проби в термостаті при температурі  $30 \pm 1$  °С протягом 5 діб;

- аналіз наявності мікроорганізмів - мезофільних клостридій.

При наявності в посівах на живильному середовищі ознак росту мікроорганізмів (у середовищі Кітт-Тароцці - помутніння, газоутворення, поява осаду тощо) констатують присутність в продукті спороутворюючої мезофільної мікрофлори.

Належність виявлених мікроорганізмів до клостридій підтверджують відсутністю утворення каталази. Для цього відбирають пробу, нейтралізують її розчином NaOH або HCl. Нейтралізовану культуральну рідину переносять на предметне скло, витримують 30 секунд і додають H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Якщо через 30-60 секунд утворюються бульбашки, то вважають, що вони з'явилися в результаті розщеплення H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> каталазою, синтезованою мікроорганізмами.

Клостридії каталазу не утворюють. У цьому випадку констатують, що в пробі немає клостридій.

Якщо в досліджуваній пробі виявлені спороутворюючі грампозитивні паличкоподібні мікроорганізми, які не утворюють каталазу, вважають, що в ній присутні анаероби роду *Clostridium*. Паралельно також вивчають морфологічні, культуральні та фізіологічні властивості, здатність до спороутворення культури мезофільних клостридій, що виросла, та ідентифікують наявність патогенних видів *Clostridium botulinum* та/або *Clostridium perfringens*.

Якщо в пробі досліджуваного продукту ці мікроорганізми ідентифіковані, продукт підлягає знищенню.

Недоліком цього способу є, в першу чергу, тривалість. Настільки довга процедура ідентифікації *Clostridium perfringens* неприйнятна для багатьох видів швидкопсувної харчової продукції. Також слід зазначити багатоетапність і суб'єктивність цього методу. На першому етапі (середовище Кітт-Тароцці) вивчаються морфологія, фізіологічні і деякі культуральні ознаки, на підставі яких проводиться родова ідентифікація, на наступному етапі - видова. Видова ідентифікація *Clostridium perfringens* даним методом проводиться візуально, що призводить до впливу суб'єктивних факторів на результат аналізу. Наведений спосіб передбачає виділення культур мікроорганізмів для ідентифікації.

Описаний спосіб вирішує поставлену задачу іншим шляхом з використанням інших засобів. Тому він не може бути взятий як прототип.

З науково-технічної та патентної літератури заявниками не знайдено способів визначення санітарної безпеки харчових продуктів шляхом таксономічної ідентифікації *Clostridium perfringens*, а також невідомо його кількісне визначення.

У зв'язку з цим, будь-який з описаних або відомих заявникам способів визначення санітарної безпеки харчових продуктів шляхом виявлення *Clostridium perfringens* не може бути вибраний як прототип.

В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб визначення санітарної безпеки харчових продуктів шляхом видової і кількісної ідентифікації *Clostridium perfringens* в харчових продуктах зі змішаною мікрофлорою без виділення чистої культури, який забезпечує підвищення чутливості та суттєве прискорення способу.

Поставлена задача вирішена в способі визначення санітарної безпеки харчових продуктів шляхом виявлення *Clostridium perfringens* в харчовій сировині та продуктах її переробки, відповідно до якого клітини різних мікроорганізмів, які містяться в досліджуваному зразку, відділяють від основної біомаси зразка, виділяють клітини мікроорганізмів, проводять лізис клітин мікроорганізмів в присутності інгібітора ДНКаз і піддають ПЛР-аналізу з використанням праймерів, специфічних до гена 16S рибосомальної РНК *Clostridium perfringens*. При виявленні заданої праймерами довжини амплікона визначають кількість копій геномної ДНК *Clostridium perfringens*, за якою роблять висновок про санітарну безпеку харчових продуктів.

Як праймери, специфічні до гена 16S рибосомальної РНК *Clostridium perfringens*, використовують праймери 5'-AGGAGCAATCCGCTATGAGAT-3' і 5'-CCTTCATCACTCACGCGCGT-3' Висновок про наявність в пробі *Clostridium perfringens* роблять при виявленні ампліконів з довжиною 209 нуклеотидних пар (н.п.).

Висновок про ступінь санітарної безпеки харчових продуктів роблять по кількості виявлених копій ДНК *Clostridium perfringens* з урахуванням регламентованих норм.

Досягнення заявленого технічного результату і неочевидність способу, що заявляється, можна пояснити наступним.

Генетична детермінанта 16S рРНК у *Clostridium perfringens* має розмір 1462 н.п. відповідно до даних GenBank, і декілька разів дублюється в геномі бактерій (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M59103>).

Ген 16S рРНК несе як консервативні, так і варіабельні ділянки нуклеотидної послідовності, що дозволяє використовувати її для проведення видового типування. Нами була виявлена консервативна ділянка гена 16S рРНК, характерна тільки для виду *Clostridium perfringens*. Використання праймерів для детектування *Clostridium perfringens* було перевірено як на чистих культурах, так і на екстрактах ДНК, виділених з харчових продуктів.

Заявниками виявлено та запропоновано використовувати фрагмент ДНК, що відповідає за транскрипцію 16S рРНК *Clostridium perfringens*, який вирізає ділянку довжиною 209 нуклеотидів

за допомогою наступних праймерів: 5'-AGGAGCAATCCGCTATGAGAT-3' і 5'-CCTTCATCACTCACGCGCGT-3'.

Для підтвердження специфічності праймерів до *Clostridium perfringens* здійснювали процедуру підтвердження низької гомологічності праймера до інших мікроорганізмів. Для цього проводили ПЛР-аналіз з розробленою парою праймерів для ряду мікроорганізмів, що становить 18 зразків і включають 2 зразки роду *клостридій*, які є близькородинними видами *Clostridium perfringens*, а також деякі *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, які є факультативними анаеробами, і 15 зразків грампозитивних бактерій (*Clostridium perfringens* є грампозитивними мікроорганізмами), і деякі грамнегативні мікроорганізми. Штами мікроорганізмів приведені в таблиці 1.

Визначення специфічності праймерів до *Clostridium perfringens*.

Мікроорганізми культивували при 37 °С в заздалегідь стерилізованому середовищі для анаеробів - згідно з ДСТУ 5093 - в середовищі Кітт-Тароцці. Для цього на дно пробірок вносили досліджуванний продукт з негайним нашаруванням вазелінового масла шаром заввишки близько 2 см або досліджуванний продукт висівали глибинним методом в чашки Петрі і заливали цукровим кров'яним агаром по Цейслеру, або агаром Вільсона-Блера. Вміст чашок Петрі швидко, обережними круговими рухами перемішували. Після застигання середовища чашки підсушували і заливали тим же середовищем так, щоб висота другого шару живильного середовища була не менше 4 мм.

Посіви на чашках Петрі термостатували при температурі (37±1)°С протягом 18-24 годин в анаеростаті з розрідженням 0,6-0,8 атм (0,4-0,6) • 10<sup>6</sup>Па або в анаеробних умовах, вказаних в ГОСТ 30425 (з нашаруванням вазелінового масла). Аеробні і факультативно-анаеробні мікроорганізми вирощували (культивували) в аеробних умовах на соєвому бульйоні з трипсином або м'ясному бульйоні з дріжджовим екстрактом 0,5 % при температурі 37 °С.

Дослідження специфічності праймерів проводили як для окремих культур, так і для композицій декількох культур. Розроблені праймери строго специфічні для виду *Clostridium perfringens*, причому його виявлення можливе як в експериментах з одним видом культури, так і в змішаній мікрофлорі. Цей результат особливо важливий при дослідженнях харчової сировини і харчових продуктів.

Результати ампліфікації гена 16S рРНК *C. perfringens* (209 н.п.) методом ПЛР-аналізу порівняно з ПЛР-аналізом геномної ДНК, виділеною з інших бактерій (5 × 10<sup>5</sup> клітин) приведені на фіг. 1, з якого видно, що тільки у разі наявності *C. perfringens* може бути отримана позитивна відповідь. Інші мікроорганізми не виявляються. Більш розширені результати дослідження специфічності заявленого способу наведені в таблиці 1.

Визначення чутливості заявленого способу виявлення *Clostridium perfringens* для визначення санітарної безпеки харчових продуктів.

Нічну культуру *Clostridium perfringens*, що виросла на цукровому кров'яному агарі, використовували для аналізу. Кількість мікробних клітин визначали прямим підрахунком з використанням мікроскопа. Клітини ресуспендували в дистильованій воді з розрахунку приблизно 10<sup>6</sup> клітин на 1 мл, з якої готували розбавлені клітинні суспензії з концентраціями: 1×10<sup>5</sup>, 5×10<sup>4</sup>, 15×10<sup>3</sup>, 10×10<sup>3</sup>, 5×10<sup>3</sup>, 2×10<sup>3</sup> клітин в 1 мл. В отримані зразки додавали 0,25 % Тритона X-100, 50 мкл 2-меркаптоетанола як інгібітор ДНКаз, прогрівали протягом 10 хвилин при температурі 95 °С і негайно охолоджували в холодній воді, центрифугували при 5700g. Відібрані аліквоти зразків піддавали ПЛР-аналізу. Аналіз продуктів ПЛР ампліфікації за допомогою гелю електрофорезу показаний на рис. 2. Аналітична чутливість ПЛР-аналізу гена 16S рРНК для *Clostridium perfringens* складає не менше 2 клітин в 1 мкл проби.

Здійснення заявленого способу.

Заявлений спосіб визначення безпеки харчового продукту включає наступні етапи:

I) відбір проб для аналізу

II) виділення ДНК з отриманих проб

III) проведення ПЛР-аналізу.

IV) аналіз продуктів ПЛР-аналізу.

V) оцінка безпеки зразків харчових продуктів

I Етап. Відбір проби для аналізу здійснюється залежно від видів зразків харчових продуктів.

Варіант 1 (з додаванням води).

Зразки цілого непошкодженого харчового продукту (огірки, морква, томати, сарделі, порційні шматки м'яса та ін.) масою 100 г поміщають в целофановий пакет, заливають 50 мл дистильованої води і добре перемішують протягом 10-15 хвилин. Змивну воду зливають і піддають центрифугуванню при 300 обертів/хвилину впродовж 10 хвилин. Далі з середньої частини центрифугата відбирають 40 мл зразка і піддають повторному центрифугуванню при 10000 обертів/хвилину впродовж 10 хвилин. Далі з нижньої частини центрифугата відбирають

0,5 мл проби, що містить концентрат мікроорганізмів, для аналізу. Розраховують масу зразка, представлену в 1 мл підготовленої проби для аналізу  $P=(40 \text{ мл}/50 \text{ мл}) \cdot (100 \text{ г}/0,5 \text{ мл})= 160 \text{ г/мл}$ .

Варіант 2 (з додаванням води).

Для гомогенних, пастоподібних харчових продуктів, соусів (овочеві закусоці консерви: аджика, ікра овочева, лечо, салати овочеві в соусах, кетчупи і томатна паста, неконцентровані томатопродукти, фруктові пюре, пюре з моркви, зелені овочі тощо), а також м'ясних паштетів, фаршів, сальтисону та ін. Відбирають пробу 100 г і заливають 20 мл дистильованої води, добре перемішують впродовж 15 хвилин. Далі дають відстоятися протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Відбирають аликвоту 20 мл і піддають центрифугуванню при 300 об./хв. впродовж 10 хвилин або фільтрують. Далі з середньої частини центрифугата або фільтрату відбирають 15 мл зразка і піддають центрифугуванню при 10000 об./хв. впродовж 10 хвилин. Далі з нижньої частини центрифугата відбирають 0,5 мл проби, яка містить концентрат мікроорганізмів, для аналізу. Розраховують масу зразка, представлену в 1 мл підготовленої проби для аналізу  $P = (15 \text{ мл}/20 \text{ мл}) \cdot (100 \text{ г}/0,5 \text{ мл})= 150 \text{ г/мл}$ .

Варіант 3 (без додавання води).

Для овочевих і фруктових соків при контролі перед стерилізацією, а також цілюноксервованих консервів (горошок зелений в заливці, перець натуральний в заливці та ін.). Продукт струшують (перемішують в упаковці), розкривають, відбирають аликвоту 100 мл (для соків, для цілюноксервованих продуктів аликвоту відбирають лише із заливки) і фільтрують через фільтрувальний папір або ватний диск. Фільтрат піддають центрифугуванню при 300 об./хв. впродовж 10 хвилин. Далі з середньої частини центрифугата відбирають 50 мл зразка і піддають повторному центрифугуванню при 10000 об./хв. впродовж 10 хвилин. Далі з нижньої частини центрифугата відбирають 0,5 мл проби, яка містить концентрат мікроорганізмів, для аналізу. Розраховують масу зразка, представлену в 1 мл підготовленої проби для аналізу  $P=(50 \text{ мл}/100 \text{ мл}) \cdot (100 \text{ мл}/0,5 \text{ мл})=100 \text{ мл/мл}$ .

Зразки, підготовлені за вищевикладеними схемами, використовують для аналізу того ж дня. Допускається зберігання зразків при температурі 2-4 °С протягом 48 годин. При значному вмісті жирів в пробах проводиться додаткова екстракція сумішшю неполярних розчинників з водою для переводу мікроорганізмів, що містяться у харчовому продукті, у водну фазу, з якої і проводиться подальше очищення.

II етап. Виділення ДНК з отриманих проб.

Для проведення ПЛР-аналізу необхідно в першу чергу виділити ДНК мікроорганізмів з проби. Існує багато способів виділення ДНК. Для проведення аналізу можна скористатися будь-яким з існуючих методів виділення ДНК, єдиною вимогою є обов'язкове внесення інгібіторів ДНКаз при проведенні виділення ДНК будь-яким з методів. Наприклад, при використанні методу теплового лізису, проводять наступні операції.

В пробу, підготовлену за будь-яким з вказаних вище варіантів I етапу, об'ємом 0,5 мл додають 20 мкл 2-меркаптоетанолу як інгібітор ДНКаз і 30 мкл 10 % Тритона X-100 і перемішують в вортексі. Потім вміст прогрівають протягом 10 хвилин при температурі 95 °С і негайно охолоджують на льоду. Далі пробірку поміщують в центрифугу і центрифугують при 5700 об./хв. і не торкаючись дна пробірки переносять 500 мкл вмісту в нову пробірку. Розраховують коефіцієнт розбавлення проби  $R=(500\text{мкл} +20 \text{ мкл} +30 \text{ мкл})/500 \text{ мкл}=1,1$ .

III етап. Проведення ПЛР-аналізу.

Готують реакційну суміш для проведення ПЛР-аналізу. Для цього розморожують реактиви на льоду. Змішують компоненти для ПЛР-аналізу в 25 мкл об'єму, що складаються з 10 мМ трис-НCl (рН 8,3), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфату, 0,5 μМ кожного праймера і 4 одиниці AmpliTaq Gold ДНК-полімерази (Roche). Додають 25 мкл проби і поміщують вміст в ПЛР машину, наприклад в 9600 GeneAmp (Перкін Елмер). Задають 35 циклів ампліфікації, кожен з яких складається з 1 хвилини при 94 °С, 1 хвилини при 53 °С і 1 хвилини при 72 °С. Після закінчення ПЛР-аналізу проби охолоджують до 4 °С.

IV етап. Аналіз продуктів ПЛР-аналізу.

Аналіз можна проводити різними методами. При використанні ПЛР-аналізу в реальному часі детекцію і кількісний аналіз проводять для ампліконів з розміром 209 н.п. У разі використання електрофорезу, продукти ампліфікації спочатку якісно ідентифікують в 2 % агарозному гелі з бромистим етідієм. Для детекції ампліконів розміром 209 н.п. використовують маркери в діапазоні 200-220 н.п. Якщо немає необхідності кількісного визначення, то проводять тільки якісний аналіз. Якісні результати ПЛР-аналізу оцінюють, порівнюючи розмір отриманих ампліконів з розміром маркерів. У разі відсутності ампліконів з розмірами 209 н.п., отримані результати слід вважати негативними. Такі результати свідчать про відсутність ДНК Clostridium perfringens в досліджуваних зразках.

У разі потреби кількісного визначення його здійснюють шляхом побудови калібрувального графіка з вимірюванням кількості копій ДНК. Для проведення аналізу 15 мкл продуктів ПЛР піддають електрофорезу на 2,0 % агарозному гелі і візуалізують фарбуванням гелю 0,5 мг/мл етідія броміду. Визначають наявність плям розміром 209 н.п. шляхом порівняння їх положення з маркером, які фотографують. Зразок фотографії гелю, що містить продукти ПЛР, представлений на рис 3. Кількісний вміст продуктів ПЛР в гелі вимірюють шляхом обробки фотографії за допомогою програми ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), що дозволяє визначити щільність кожної плями.

Побудова калібрувального графіка. Вирощували культуру *Clostridium perfringens*. Кількість мікробних клітин в культурі визначали прямим підрахунком з використанням мікроскопа. Клітини ресуспендували в дистильованій воді з розрахунку приблизно  $10^6$  клітин на 1 мл, з якої готували розбавлені клітинні суспензії з концентраціями:  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $15 \times 10^3$ ,  $10 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$  клітин в 1 мл. В отримані зразки додавали 0,25 % Тритона X-100, 50 мкл 2-меркаптоетанолу як інгібітор ДНКаз, прогрівали протягом 10 хвилин при температурі 95 °C і негайно охолоджували в холодній воді, центрифугували при 5700g. Відбирали аліквоти об'ємом 25 мкл, які піддавали ПЛР-аналізу, як наведено вище. Продукти ПЛР аналізували за допомогою гелю електрофорезу як показано на фіг. 3. Кількісний вміст продуктів ПЛР в гелі вимірювали шляхом обробки фотографії за допомогою програми ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). За отриманими результатами будували калібрувальний графік (Фіг. 3). Регресійне рівняння, отримане при побудові цього графіка, дозволяє визначити концентрацію *Clostridium perfringens* в 1 мл об'єму проби по формулі:

$$X=Y/0,548$$

Де X - шукана концентрація *Clostridium perfringens* в 1 мл об'єму проби, а Y - щільність плями на гелі, що представляє шуканий продукт ПЛР-аналізу.

V етап. Оцінка безпеки зразків харчових продуктів.

На підставі отриманих результатів ПЛР-аналізу і визначення кількості клітин *Clostridium perfringens*, що знаходилися в пробі, переходять до визначення ступеня безпеки досліджуваного харчового продукту. Звідна таблиця норм за нормативними документами (СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078-01, введені з 01.09.2002 р.; Інструкція про порядок санітарно-технічного контролю консервів на виробничих підприємствах, оптових базах, в роздрібній торгівлі та на підприємствах громадського харчування №1 4.4.4.077-2001, затверджена постановою Головного державного санітарного лікаря України від 07.11.2001. - № 140), що діють, наведена в Таблиці 2.

Приклад 1. Проводили аналіз ступеня безпеки ковбасних виробів вищого сорту (сардельки). Для цього проводили визначення наявності мікроорганізмів виду *Clostridium perfringens* і їх кількісний вміст. Для цього готували пробу наступним чином. Сардельки масою 301,2 г поміщали в целофановий пакет, заливали 150 мл дистильованої води і добре перемішували протягом 10-15 хвилин. Змивну воду зливали і піддавали центрифугуванню при 300 об./хв. впродовж 10 хвилин. Далі з середньої частини центрифугата відбирали 120 мл зразка і піддавали повторному центрифугуванню при 10000 об./хв. впродовж 10 хвилин. Далі з нижньої частини центрифугата відбирали 0,5 мл проби, що містить концентрат мікроорганізмів, для аналізу. Розраховували масу зразка, представлену в 1 мл підготовленої проби для аналізу  $R=(120 \text{ мл}/150 \text{ мл}) \cdot (301,2 \text{ г}/0,5 \text{ мл})=481,9 \text{ г/мл}$ .

Виділення ДНК з отриманої проби проводили методом теплового лізису. Для цього в пробу додавали 20 мкл 2-меркаптоетанолу як інгібітор ДНКаз і 30 мкл 10 % Тритона X-100 і перемішували в вортексі. Потім вміст прогрівали протягом 10 хвилин при температурі 95 °C і негайно охолоджували на льоду. Далі пробірку поміщали в центрифугу і центрифугували при 5700 об./хв. і не торкаючись дна пробірки переносили 500 мкл вмісту в нову пробірку. Розраховували коефіцієнт розбавлення проби  $R=(500 \text{ мкл} + 20 \text{ мкл} + 30 \text{ мкл})/500 \text{ мкл} = 1,1$ .

Проведення ПЛР-аналізу і аналіз продуктів ПЛР-аналізу проводили аналогічно тому, як наведено в етапах III і IV. В результаті проведеного аналізу на агар-гелі виявлена пляма розміром 209 н.п., що належить ДІЖ *Clostridium perfringens* з щільністю 830 одиниць за шкалою ImageJ. Розрахована за вище наведеною формулою шукана концентрація *Clostridium perfringens* склала:  $X=830/0,548=1514,5$  клітин в мл проби. З урахуванням розбавлення проби дійсна концентрація *Clostridium perfringens* склала  $1514,5 \times 1,1=1666$  клітин/мл. Оскільки 1 мл проби був представлений масою, що становить 481,9 г, то якщо узяти регламентовану наважку 0,01 г, як це передбачено СанПиН 2.3.2.1078-01 і Інструкцією № 1 4.4.4.077-2001, забруднення виробу *Clostridium perfringens* виражатиметься величиною  $(1666 \times 0,01)/481,9=0,03$  клітин, що при округленні до 1 дає 0. Це дозволяє віднести даний продукт до безпечного для вживання.

Приклади 2-8 пояснюють визначення санітарної безпеки шляхом виявлення *Clostridium perfringens* в різних харчових продуктах і харчовій сировині аналогічно тому, як наведено в Прикладі 1. Дані наведені в Таблиці 2.

Таблиця 1

Результати, що ілюструють видоспецифічність заявленого способу

Вид мікроорганізму	Штам	Результат ПЛР-дослідження
<i>Clostridium perfringens</i>	ККМ0П-2	+
<i>Clostridium perfringens</i>	ККМ0П-6	+
<i>Clostridium perfringens</i>	МЛК3-3	+
<i>Clostridium perfringens</i>	ККМ0П-21	+
<i>Clostridium sporogenes</i>	25	-
<i>Clostridium butyricum</i>	ККМ0П-1	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	В-7004	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ККМБ-1	-
<i>Lactobacillus casei</i> sp. casei	В-7017	-
<i>Bacillus licheniformis</i> sp.	В-7088	-
<i>Bacillus subtilis</i>	В-7025	-
<i>Bacillus subtilis</i>	В-7018	-
<i>Bacillus cereus</i>	ККМ0П-1	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	ТА100	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	ТА98	-
<i>Proteus vulgaris</i>	ККМ0П-1	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	МЛК3-7	-
<i>Escherichia coli</i>	МЛК3-2	-

5

Таблиця 2

Визначення ступеня санітарної безпеки шляхом виявлення *Clostridium perfringens* в різних харчових продуктах і харчовій сировині по СанПіН 2.3.2.1078-01 і Інструкції № 14.4.4.077-2001

№ п/п прикладу	Досліджуваний зразок	Маса, г	Характеристика проби Р, що представляє зразок (г/мл) або (мл/мл)	Щільність продукту ПЛР (ум. од.)	Концентрація <i>Clostridium perfringens</i> в пробі (клітин/мл)	Регламентована наважка (г)	Закруглена до 1 кількість копій <i>Clostridium perfringens</i> , присутня в регламентованій наважці	Ступінь санітарної безпеки
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Ковбаса варена, вищий сорт	301,2	481,9	830	1666	0,01	0	продукт безпечний/високий рівень безпеки
2	Окіст свинячий варений	150	200	40250	80793	0,01	4	продукт небезпечний
3	Бекон свинячий варений	200	320	0	0	0,01	0	продукт безпечний/високий рівень безпеки
4	Ковбаса сирокочена "Салямі"	120	192	12890	25875	0,01	1	продукт небезпечний



Продовження таблиці 2

5	Сік моркв'яний	100	100	1210	2429	0,1	2	продукт небезпечний
6	Консерви "Зелений горошок"	100	100	110	622	0,1	0	продукт безпечний/високий рівень безпеки
7	Томати цільно-консервовані	200	200	0	0	0,1	0	продукт безпечний/високий рівень безпеки
8	Томати свіжі	315,3	504,5	220	442	0,5	0	продукт безпечний/високий рівень безпеки

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

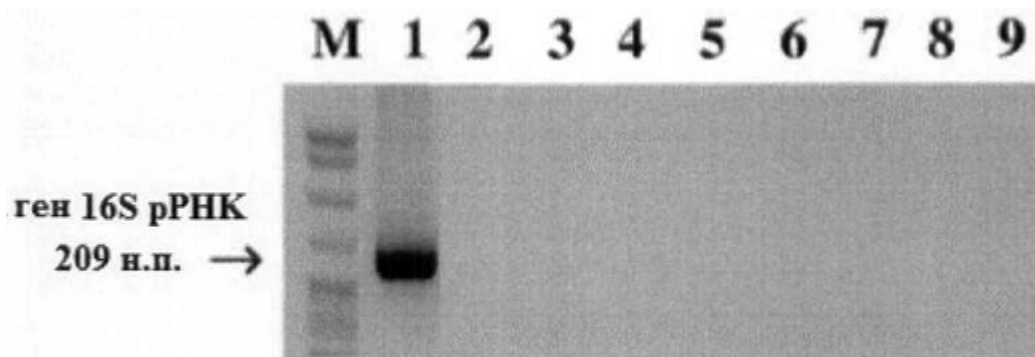
5

1. Спосіб визначення *Clostridium perfringens* в харчових продуктах, відповідно до якого з основної біомаси зразка виділяють клітини мікроорганізмів, проводять їх лізис в присутності інгібітора ДНКаз і піддають ПЛР-аналізу з використанням пари праймерів, специфічних до гена 16S рибосомальної РНК *Clostridium perfringens*, який **відрізняється** тим, що амплікон геномної ДНК *Clostridium perfringens*, що виявляють, складає 209 нуклеотидних пар, а як пару праймерів, специфічних до гена 16S рибосомальної РНК *Clostridium perfringens*, використовують пару праймерів 5'-AGGAGCAATCCGCTATGAGAT-3' і 5'-CCTTCATCACTCACGCGGCGT-3'.

10

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що висновок про ступінь санітарної безпеки харчових продуктів роблять по кількості виявлених копій ДНК *Clostridium perfringens* з урахуванням регламентованих норм.

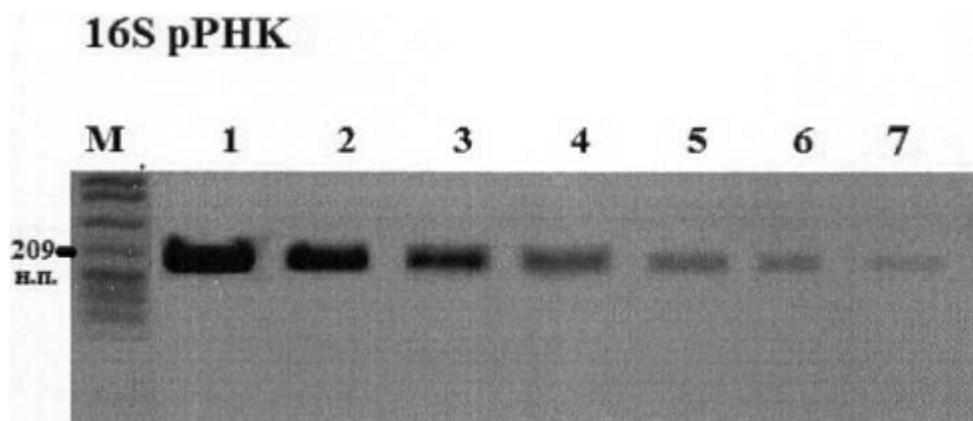
15



Фіг. 1

Результати ампліфікації гена 16S рРНК *C. perfringens* (209 н.п.) методом ПЛР у порівнянні з ПЛР геномної ДНК ( $5 \times 10^5$  екземплярів) виділеної з інших бактерій:

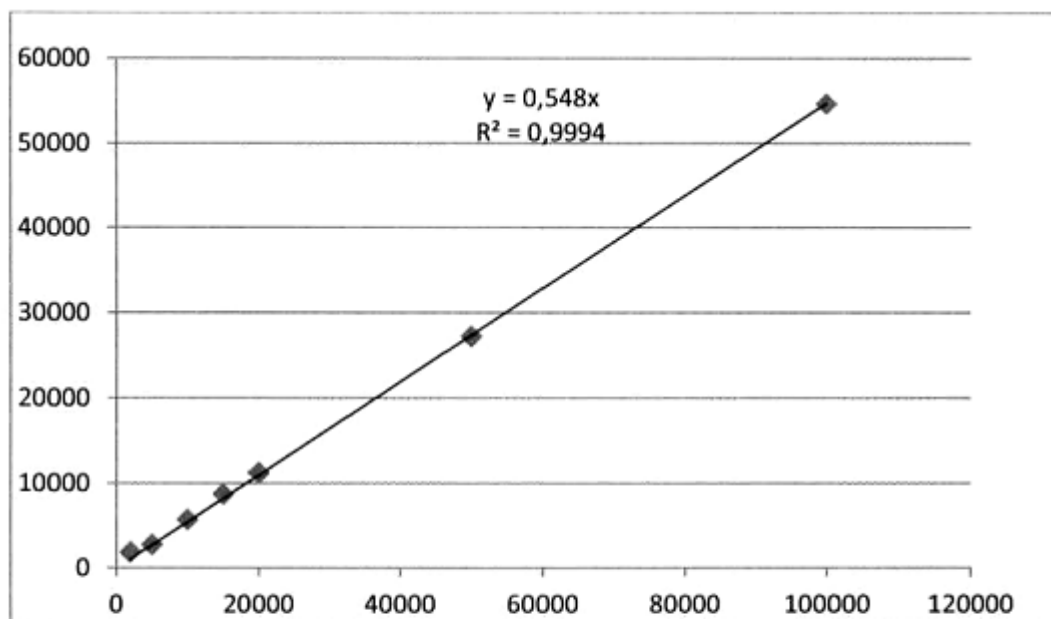
- Смуга 1-*Clostridium perfringens*
- Смуга 2-*Clostridium butyricum*
- Смуга 3-*Clostridium sporogenes*
- Смуга 4-*Lactobacillus plantarum*
- Смуга 5-*Bacillus licheniformis* sp.
- Смуга 6-*Bacillus subtilis*
- Смуга 7-*Proteus vulgaris*
- Смуга 8-*Bifidobacterium adolescentis*
- Смуга 9-*Bacillus cereus*
- Смуга М містить ДНК маркери.



Фіг. 2

Візуалізація продуктів ППР аналізу 16S рРНК гена ДНК генома *Clostridium perfringens* за допомогою електрофорезу на 2 % агар-гелі. Смуги на гелі відповідають наступним концентраціям клітин:

- Смуга 1 - 100000 клітин в 1 мл
- Смуга 2 - 50000 клітин в 1 мл
- Смуга 3 - 20000 клітин в 1 мл
- Смуга 4 - 15000 клітин в 1 мл
- Смуга 5 - 10000 клітин в 1 мл
- Смуга 6 - 5000 клітин в 1 мл
- Смуга 7 - 2000 клітин в 1 мл
- Смуга М містить ДНК маркери.



Фіг. 3

Калібрувальний графік, побудований за результатами ППР-аналізу 16S рРНК генів, отриманих при розбавленні чистої культури *Clostridium perfringens*. На вісі X представлені концентрації *Clostridium perfringens*, виражені числом клітин в 1 мл об'єму. На вісі Y представлені денситометричні одиниці, отримані при обробці фотографії гелю програмою ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

---

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601