https://doi.org/10.53587/25792865-2021.6-18

ՍՆՆԴԱՄԹԵՐՔԻ ՓՈՐՁԱՔՆՆՈՒԹՅԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ ԿԻՐԱՌՎՈՂ ՄԱՆՐԷԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱՂՏՈՏՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ԱՐԱԳ ՀԱՅՏՆԱԲԵՐՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Նիկոլյան Ս.Հ. , Ցականյան Ա.Վ., Անդրեասյան Ն.Ա.

Փորձաքննությունների ազգային բյուրո,
Երևան, Հայաստան

Սննդամթերքի անվտանգության խնդիրն ունի կենսական նշանակություն, քանի որ անվտանգության կանոնները չպահպանելու դեպքում այն կարող է տարբեր ախտածին մանրէների աղբյուր հանդիսանալ: Սննդի միջոցով տարածվող բազմաթիվ հիվանդությունների պատճառը դրանում առկա ախտածին միկրոօրգանիզմներ են, քանի որ մարդու առողջությանը ուղղակիորեն սպառնացող հիվանդությունների հարուցիչներից բացի, ախտածին մանրէները կարող են հանգեցնել բնակչության թունավորման՝ սննդի ախտահարման միջոցով: Հետևաբար, սննդի փորձաքննությունն ունի կարևոր նշանակություն հանրային առողջության պահպանման գործում (գործընթացում):

Սննդի փորձաքննության պարտադիր մաս են կազմում դրանց անվտանգության, մասնավորապես՝ մանրէաբանական ցուցանիշների որոշումը: Յուրաքանչյուր սննդամթերքի համար որոշվում են իրեն մենահատուկ մանրէաբանական ցուցանիշներ, որոնք սահմանվում և նորմավորվում են տվյալ սննդատեսակի ոլորտը վերահսկող տեխնիկական կանոնակարգերով:

Տեխնիկական կանոնակարգերով նորմավորվող մանրէների հայտնաբերումը սննդի փորձանմուշում մեծամասամբ իրականացվում է ընտրողական ագարային սննդամիջավայրերում աճած գաղութների հաշվարկման մեթոդով: Նշված մեթոդը համարվում է «ոսկե ստանդարտ», որն ընկած է ISO հավաստագրում ունեցող մի շարք միջազգային ստանդարտների հիմքում (ISO 4831:2006, ISO 6579-1:2017, ISO 6888-2:2021, ISO 4833-2:2013) և բավականին ճշգրիտ մեթոդ է, սակայն և ժամանակատար:

Երբեմն սննդային փորձաքննություններում էական է հետազոտության արդյունքների ստացման տևողությունը, հատկապես զանգվածային թունավորումների դեպքում: Այս տեսանկունից կարևոր է նոր, ավելի արագ իրականացվող մեթոդների կիրառումը, ինչպիսիք են ԴՆԹ-ի անջատման կիտերի վրա հիմնված իրական ժամանակի ՊՇՌ մեթոդը և նուկլեինաթթուների հաջորդականության վրա հիմնված ամպլիֆիկացումը (ՆՀԱ):

Բանալի բառեր. *սննդամթերքի փորձաքննություն, մանրէաբանական աղտոտվածություն, կենսասենսորներ, ախտածին բակտերիաներ, պոլիմերազային շղթայական ռեակցիա:*

Սննդային վարակներ առաջացնող բակտերիաներից են *Campylobacter spp., Salmonella spp.* և *Escherichia coli O157:H7: Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Escherichia coli*-ի էնտերոհեմոռագիկ O103:H25, O26, O111, O115, O128, O145 շտամերը և վերջերս մեկուսացված, հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունության պլազմիդ կրող O104:H4 շտամը, *Staphylococcus aureus*-ի ջերմակայուն էնտերոտոքսիններ կոդավորող շտամերը, *Clostridium*

Թղթակցական հասցեն՝ Սոնա Հազարապետի Նիկոլյան, սննդամթերքի և խմիչքների փորձաքննությունների բաժնի փորձագետի պաշտոնակատար, ՀՀ ԳԱԱ «Փորձաքննությունների ազգային բյուրո» ՊՈԱԿ, Երևանի պետական համալսարանի կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնի ասպիրանտ, ք. Երևան, Իսակովի 24, e-mail: nikolyan.sona@gmail.com

botulinum, *Clostridium perfringens, Yersinia enterocolitica, Vibrio spp., Aeromonas spp., Shigella spp.* և *Mycobacterium bovis*, վիրուսները և նախակենդանիները, որոնք փոխանցվում են սննդի սպառման միջոցով [1]:

Հում միսը, կաթը, սերմերը և բանջարեղենը տարբեր բակտերիաների աղբյուր են: Սննդի որոշակի տեսակներ (կաթը, կրեմը, միսը) պետք է զերծ լինեն ախտածին մանրէներից, ինչպես *L. monocytogenes* և *S. aureus*-ից: Որոշ ախտածինների առկայություն, անգամ չնչին քանակությամբ, արդեն իսկ վտանգ է ներկայացնում, ինչպես սառը պայմաններում բազմացող, պսիխրոֆիլ բակտերիա *L. monocytogenes*-ը: Իսկ հյուրանոցների ջրատար խողովակներում և սանհանգույցներում *Legionella pneumophila*-ի առկայությունը համարվում է առողջության համար սպառնալիք, երբ բակտերիայի խտությունը հասնում է 1լ ջրում մի քանի հազար բջջի [2]:

Սննդի փորձաքննության մեջ ախտածին բակտերիաների հայտնաբերման ստանդարտ մանրէաբանական մեթոդն ագարային միջավայրում համապատասխան բակտերիայի գաղութների հաշվարկն է: Այն մի քանի օր է պահանջում ախտածինների հայտնաբերման համար: Բացի վերոնշյալ մեթոդից, առկա են նաև այլընտրանքային մեթոդներ, որոնք թույլ են տալիս հայտնաբերել մանրէները ավելի սեղմ ժամանակահատվածում, քան 24-48 ժ-ն է: Այլընտրանքային մեթոդները թույլ են տալիս նույնականացնել մանրէները, նույնիսկ եթե դրանք չեն հասել էքսպոնենցիալ աճի առավելագույն պիկին:

Բազմաթիվ հետազոտություններում օգտագործվել են բակտերիաների իմունամագնիսական տարանջատում լուծույթներից կամ սննդային նմուշներից: Ներկայումս գոյություն ունեցող Pathatrix Auto System-ը վալիդացվել և երաշխավորվել է օգտագործել *Salmonella spp.* և *Listeria spp.* բակտերիաների հայտնաբերման համար [1]:

Salmonella բակտերիայի հայտնաբերման համար մեծամասամբ փորձաքննության են ենթարկվում տավարի, հավի, խոզի միսը, ձուն, մրգերը, ծիլերը, բանջարեղենը, նույնիսկ վերամշակված սնունդը: Ախտածին մանրէներով ախտոտված սնունդը սովորաբար նորմալ է բուրում, որն էլ դժվարացնում է զգայաբանական ցուցանիշներով սննդային աղտոտման հայտնաբերումը [3]:

Բակտերիալ շտամերի նույնականացման ամենաբարձր զգայունություն ձեռք է բերվել մոլեկուլային մեթոդների շնորհիվ, որոնք հիմնված են պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի (իրական ժամանակի ՊՇՌ, թվային ՊՇՌ) վրա, ինչպես նաև իզոջերմային բազմապատկման մեթոդների վրա, ինչպես շրջանաձև բազմապատկումը (RCA), ռեկոմբինազ-պոլիմերազային բազմապատկումը (RPA), օղակով-միջնորդված իզոջերմային բազմապատկումը (LAMP): Բացի քանակական, իրական ժամանակի ՊՇՌ-ի միջոցով ԴՆԹ-ի քանակական գնահատումից, մշակվել են նաև այլ մեթոդներ, որոնք հիմնված են թիրախային ԴՆԹ-ի հիբրիդացման վրա՝ մակերեսին կապվող մենահատուկ զոնդերով: ԴՆԹ մեթոդների հայտնաբերման սահմանը 1մլ նմուշում տատանվում է 10-100 գաղութ առաջացնող միավորների սահմաններում [4, 5]:

Մի շարք մեթոդների դեպքում մանրէների նույնականացման համար անհրաժեշտ է, որ մանրէական կուլտուրան հասնի իր աճի էքսպոնենցիալ փուլին: Այսինքն, սկզբունքայնորեն անհրաժեշտություն է առաջացել հաղթահարել այս խոչընդոտը: Օրինակ, սննդի բաղադրակազմը դժվարեցնում է դրանից բակտերիաների անջատումը և պարունակում է ՊՇՌ արգելակիչներ, որոնք կարող են ազդել մեթոդի զգայունության վրա: Բացի այդ, բակտերիաները ենթարկվում են սթրեսի և աճի համար պահանջում են ավելի երկար ժամանակ:

Սննդի փորձաքննության մեջ կարող է կիրառվել ISO հավաստագրում ունեցող երկու նույնականացման մեթոդ. ընտրողական ագարային սննդամիջավայրերում աճած գաղութների հաշվարկման և ԴՆԹ-ի անջատման կիտերի վրա հիմնված իրական ժամանակի ՊՇՌ մեթոդը:

Նշված մոլեկուլային մեթոդը զգայուն է 10-100 բակտերիաների առկայության դեպքում (մինչև 50 մլ ծավալի դեպքում իմունամագնիսական տարանջատման հետ համակցված) [4-6]:

Բացի վերոնշյալներից, սննդի փորձաքննության մեջ օգտագործվում են նաև այլ կենսասենսորային մեթոդներ. մակերեսային պլազմոնային ռեզոնանսի (ՄՊՌ), էլեկտրաքիմիական դիմադրության սպեկտրոսկոպիայի (ԷԴՍ) և նուկլեինաթթուների վրա հիմնված մեթոդներ: Առավել զգայուն իմունասենսորները հիմնված են բակտերիալ տեսակներին մենահատուկ հակամարմինների, ապտամերների և բակտերիալ հակածինների (ինչպես բակտերիաֆագի պոչի մակերեսային սպիտակուցը) վրա [7-9]:

Նշված մեթոդները որոշակի պայմաններ են պահանջում սպիտակուցների միջև օպտիմալ կապի հաստատման համար, ինչպես նաև այլ բարձր խնամակացությամբ նյութեր, գնդիկներ (Luminex, Austin, TX, USA), ոսկով պատված մակերեսներ, թաղանթներ, որոնք հարմար են հակամարմին-հակածին կոմպլեքսների քրոմատոգրաֆիկ մեթոդով առանձնացման համար [10]:

Ներկայումս շատ կենսասենսորների վրա հիմնված մեթոդները դեռ աշխատատար, թանկարժեք և ոչ դյուրին իրականացվող կիրառություններ են և նպատակահարմար չեն սննդային փորձաքննություններում օգտագործման համար:

Իդեալական կենսասենսորը պետք է հայտնաբերի թիրախ մոլեկուլները ուղղակիորեն՝ առանց զոնդավորված լիգանդների կամ բազմապիսի լվացող միջոցների: Արդյունավետ վերլուծություն կատարելու համար պետք է լուծել մի քանի խնդիրներ: Այսպես, առաջինը՝ պետք է օգտագործել համապատասխան մակերեսներ, երկրորդը՝ արդյունավետ զոնդի (հակամարմիններ, կապող սպիտակուցներ, ապտամերներ) առկայությունն է, որը կունենա կայուն խտություն՝ բարձր վերարտադրելիությամբ թիրախների հայտնաբերման համար, երրորդը՝ ձեռք բերել մեթոդի բարձր զգայունություն նույնիսկ թիրախների ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում, քանի որ շատ ախտածին մանրէներ սննդում առկա են լինում համեմատաբար քիչ քանակներով:

Ստորև ներկայացվում է արագ իրականացվող մեթոդների ընդհանրական բնութագրերը սննդի մանրէաբանական փորձաքննության մեջ ավելի լայն կիրառություն ապահովելու նպատակով:

1. Մակերեսային պլազմոնային ռեզոնանսի մեթոդ (ՄՊՌ)

Մակերեսային պլազմոնային ռեզոնանսի կենսասենսորներն օգտագործվել են ախտածին մանրէների ուղղակի կամ անուղղակի հայտնաբերման համար [11]: ՄՊՌ-ն կարող է օգտագործվել իմունասենսորների միջոցով հարստացված արգանակներում և հեղուկներում սննդի ախտածինների հայտնաբերման համար:

ՄՊՌ տեխնիկան թույլ է տալիս իրականացնել ոսկե հաստ թիթեղի և դիէլեկտրիկ մակերեսի կամ թափանցիկ նյութի (ինչպիսին են հեղուկները) միջև տեղի ունեցող քիմիական և կենսաքիմիական փոխազդեցությունների մշտադիտարկում տվյալ պահին: ՄՊՌ-ն օպտիկական տեխնիկա է, որն օգտագործում է էլեկտրամագնիսական ալիքների ֆենոմենը սենսորի մակերեսին շատ մոտ գտնվող ռեֆրակտիվ գործակցի փոփոխությունները չափելու համար:

Ընկնող, միատարր լույսի ճառագայթով արտադրված էլեկտրամագնիսական ալիքն ի վիճակի է փոխազդել ազատ էլեկտրոնների (պլազմոնների) հետ մետաղական թաղանթում ընկնող լույսի հատուկ (α) անկյան տակ (ՄՊՌ անկյուն): Անկյունային դիրքը խիստ զգայուն է մետաղ-դիէլեկտրական մակերեսի ցանկացած փոփոխության նկատմամբ:

Ուսումնասիրված հակածնի և հակամարմնի միջև պարտադիր կապի առաջացումը դիտարկ-

վում է նվազագույն անկյունից դեպի ավելի բարձր անկյուններ հերթափոխի կամ ֆիքսված անկյան տակ անդրադարձման տատանումների (կորի առավելագույն թեքությանը համապատասխան) դեպքում: Այսպիսով, հնարավոր է պահպանել ՄՊՌ-ի անդրադարձման կորը լույսի անկման տարբեր անկյունների դեպքում: Հարկ է նշել, որ 10,000 ԳԱՄ/մլ կոնցենտրացիայով *L. pneumophila*-ի բջջային սուսպենզիան հայտնաբերվել է ՄՊՌ-ի իմունասենսորների միկրոհեղուկային համակարգի միջոցով [12]:

1.1 Էլեկտրաքիմիական դիմադրության սպեկտրոսկոպիա (ԷԴՍ)

Էլեկտրաքիմիական դիմադրության սպեկտրոսկոպիան (ԷԴՍ) լայնորեն կիրառվող մեթոդ է կենսասենսորային սարքերի ոլորտում և ներառում է մեկանգամյա չիպեր [13, 14]: Յուրաքանչյուր էլեկտրոդ խորհուրդ է տրվում օգտագործելուց հետո դեն նետել, որպեսզի կանխվի դրա միջոցով փոխանցվող աղտոտումը: Բարձր զգայունության և հեշտ կառուցվածքի շնորհիվ ԷԴՍ-ն լայնորեն կիրառվում է կենսասենսորների արտադրությունում, հատկապես մանրէաբանության ոլորտում: Ի դեպ, 1990թ-ից դիմադրության վրա հիմնված մեթոդներն օգտագործվում են բակտերիաների նույնականացման մեջ:

Այս մեթոդը գրանցում է բակտերիաների նյութափոխանակության և բջջի աճի միջոցով մակածված սենսորների էլեկտրական դիմադրությունը, որը կենդանի բջիջների նյութափոխանակային իոնների անջատման արդյունք է (կատաբոլիզմի արդյունքում առաջացած ածխաթթու գազ, օրգանական թթուներ և բջջի թաղանթի միջոցով իոնների փոխանակում): Այս մեթոդի կիրառության օրինակ է կենսունակ և մահացած բջիջների տարբերակումը [15, 16]: Այն օգտագործվել է նաև Յանգի և գործընկերների կողմից, ովքեր օգտագործել են էլեկտրոդների 3 դասավորություն՝ *S. typhimurium*-ի կենսունակ բջիջների էլեկտրական դիմադրության միջոցով հայտնաբերման համար [17, 18]:

Քանի դեռ էլեկտրոդների մակերևույթում փոփոխություններ տեղի չեն ունենում, համակարգը կարելի է նկարագրել պարզեցված համարժեք շրջանի տեսքով, որը բաղկացած է երկու էլեկտրոդների միջև լուծույթի հետ կապված դիմադրատարրից և յուրաքանչյուր էլեկտրոդի համար երկշերտ կոնդենսատորից: Նշված երկու բաղադրիչները որոշում են ամբողջ դիմադրությունը՝ կախված հաճախությունից: Բարձր հաճախությունների դեպքում դիմադրությունը հիմնականում պայմանավորված է դիմադրատարրով, մինչդեռ ցածր հաճախությունների դեպքում՝ երկշերտ կոնդենսատորով: Ցույց է տրված, որ և՛ կոնդենսատորի, և՛ դիմադրատարրի դիմադրության չափումները կարող են օգտագործվել բակտերիաների քանակական որոշման համար [17]:

Անցած մի քանի տարիների ընթացքում միկրոսարքերի արտադրության նվաճումների շնորհիվ իրականացվել են դիմադրության չափման վրա հիմնված կենսասենսորների չափերի կոմպակտացում դեպի չիպային ձևաչափ, որն առաջարկում է նոր հնարավորություններ բակտերիաների հայտնաբերման ոլորտում: Այս առումով, թվայնացված միկրոէլեկտրոդներն օգտագործվել են մաքուր կուլտուրայում և կաթի նմուշներում դիմադրության չափումների միջոցով *S. typhimurium*-ի քանակական հայտնաբերման համար [18]: Թվայնացված միկրոէլեկտրոդների դիմադրության չափման սենսորների միջոցով *S. typhimurium*-ի հայտնաբերման ժամանակը ավելի կարճ է դասական դիմադրության չափման վրա հիմնված մեթոդների համեմատ, իսկ իր բնույթով՝ առավել մոտ է էլեկտրաքիմիական մեթոդներին: Հայտնաբերման սահմանը 0.5 ԳԱՄ/մլ է, իսկ ժամանակը՝ 10 ժամից ավել [18]:

Բացի նշվածներից, միկրոէլեկտրոդային համակարգերը թույլ են տալիս էլեկտրոդային մակերեսներին կապվել բակտերիալ մենահատուկ բջիջների հետ: Արդյունքում դիտվում են մենա-

հատուկ կենսաճանաչման ռեակցիաներ, որոնց շնորհիվ այս մեթոդը հնարավորություն է տալիս տարբեր բակտերիալ խմբերից հայտնաբերել որոշակի խումբ, նույնիսկ բարդ խմբավորումների առկայության պայմաններում: Ավելին, հետազոտության համար անհրաժեշտ ժամանակը բավականին կրճատվում է՝ 2 ժամից պակաս, համեմատած աճի վրա հիմնված դիմադրության չափման մեթոդների հետ, որոնք պահանջում են առնվազն 24 ժամ: Օրինակ 2002 թ-ին Ռուանը և գործընկերները զարգացրեցին դիմադրության չափման վրա հիմնված կենսասենսորներ *Escherichia coli* O157:H7-ի հայտնաբերման համար էլեկտրոդների վրա իմմոբիլիզացված բակտերիաների հետ մենահատուկ հակամարմինների փոխազդեցության միջոցով [19]: *Escherichia coli* O157:H7-ի տարածման հիմնական աղբյուրը աղտոտված ջուրն ու սնունդն է, մասնավորապես՝ հում կաթը, չպաստերիզացված կաթնամթերքը, մրգահյութերը:

Նշված մթերքների փորձաքննության մեջ առաջնային է համարվում աղիքային խմբի մանրէների, հատկապես *Escherichia coli* O157:H7-ի առկայության որոշումը: Երկրորդային հակամարմինը կոնյուգացվում է ալկալին ֆոսֆատազի հետ, որը որպես զոնդավորված ֆերմենտ օգտագործվել է ազդանշանների ուժեղացման համար: Այս կենսասենսորները կարող են հայտնաբերել թիրախ բակտերիան՝ 6×10^3 բջիջ/մլ-ի սահմանային արժեքի դեպքում:

Յանգը և գործընկերները կարողացել են խուսափել երկրորդային զոնդավորված հակամարմինների օգտագործումից և զարգացրել են զոնդից անկախ իմունասենսորներ վերոնշյալ բակտերիալ շտամի (*E. coli* O157:H7) հայտնաբերման համար՝ օգտագործելով ինդիումի թիթեղի օքսիդի ավելի բարձր զգայունությունը [20]:

Փաստորեն, երբ բակտերիալ բջիջները ճանաչվում են էլեկտրոդների վրա իմմոբիլիզացված, մենահատուկ հակամարմինների կողմից, ամրանում են մակերեսին և մեծացնում են էլեկտրոնի փոխանցման դիմադրությունը, որն հնարավոր է չափել առանց որևէ լրացուցիչ քայլի:

Ռադհակրիշնան և գործընկերները կարողացել են հայտնաբերել *L. monocytogenes*-ը էլեկտրաքիմիական դիմադրության սպեկտրոսկոպիայի միջոցով՝ օգտագործելով ոսկե էլեկտրոդի վրա իմմոբիլիզացված մկան մոնոկլոնալ հակամարմին [21]:

L. monocytogenes-ը առկա է հում, չպաստերիզացված կաթում և պանիրներում, պաղպաղակում, բանջարեղենում, մրգերում, թռչնամսում, ձկնամթերքում: Նշված սննդամթերքի մանրէաբանական ցուցանիշների թվում պարտադիր հետազոտվում է *L. monocytogenes*-ի առկայությունը: Ինչքան երկար սառնարանում պահվի սնունդը, այնքան ավելի մեծանում է վերոնշյալ ախտածինի առկայության հնարավորությունը: Ախտածնի աճի կանխման համար անհրաժեշտ է սառնարանի ջերմաստիճանը սահմանել +4 °C, իսկ սառցախցիկինը՝ -18°C [3]:

Ռադհակրիշնան և գործընկերները հաղորդել են նաև հայտնաբերման 5 ԳԱՄ/մլ և 4 ԳԱՄ/մլ սահմաններ համապասխանաբար իդեալական լուծույթների և լոլիկի ֆիլտրված էքստրակտի համար:

Այս մեթոդների զգայունության մեծացման համար էլեկտրոդների արտադրության մեջ օգտագործվել են նորարարական նյութեր, հատկապես՝ նանոնյութեր (նանոմասնիկներ, նանոլարեր, նանոխողովակներ և գրաֆեն): Օրինակ, Յանգը և գործընկերները ստեղծել են իմունասենսոր *Salmonella* spp.-ի հայտնաբերման համար՝ օգտագործելով ապակե ածխածնի վրա նստեցված ոսկե նանոմասնիկներ, որը բարելավել է մեթոդի զգայնությունը և կայնությունը [18]:

Իսկ Վանգն առաջարկել է օգտագործել TiO_2-ի նանոլարեր, որոնք միացված են ոսկու միկրոէլեկտրոդներով և աշխատում են հակալիստերիային հակամարմիններով՝ *Listeria monocytogenes*-ի արագ և հեշտ հայտնաբերման համար: Այս դեպքում հաղորդվել է բարձր զգայունություն և բարձր մենահատկություն՝արագ արձագանքման ժամանակի հետ համատեղ [22]:

2. Նուկլեինաթթուների վրա հիմնված մեթոդներ

Նուկլեինաթթուների վրա հիմնված մեթոդները գործածում են թիրախ ախտածիններում առկա ԴՆԹ-ի կամ ՌՆԹ-ի մենահատուկ հաջորդականությունների հայտնաբերման տեխնիկան: Վերջինս կատարվում է թիրախ նուկլեինաթթվի հաջորդականության արհեստականորեն սինթեզված օլիգոնուկլեոտիդների (զոնդեր կամ պրայմերներ) հետ հիբրիդացման միջոցով: Պրայմերները կամ զոնդերը կոմպլեմենտար են թիրախ հաջորդականությանը [23]:

Շատ ախտածին բակտերիաներ, ինչպես *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus* և *Escherichia coli O157* արտադրում են թույններ, որոնք ունակ են պատճառել սննդի միջոցով հարուցվող հիվանդություններ [24-27]: Ախտածինների թույների սինթեզն ապահովող գեները կարող են հայտնաբերվել նուկլեինաթթուների վրա հիմնված մեթոդների միջոցով [28]: Ավելին, անորոշ ֆենոտիպային բնութագրիչներ ցույց տվող ախտածինները, ինչպես հիպուրատ բացասական *Campylobacter jejuni*–ի շտամերը, կարող են նույնականացվել և հաստատվել վերոնշյալ մեթոդով [29]: Նուկլեինաթթուների վրա հիմնված մեթոդները հայտնաբերում են մենահատուկ գեներ թիրախ ախտածիններում, հետևաբար կանխում են ոչ հավաստի արդյունքերի ստացումը: Նման մեթոդների շարքին են դասվում սովորական պոլիմերազային շղթայական ռեակցիան (ՊՇՌ), բազմաբաղադրիչ ՊՇՌ-ն, իրական ժամանակի կամ քանակական ՊՇՌ-ն, նուկլեինաթթուների հաջորդականությունների վրա հիմնված բազմապատկումը, հանգույցներով միջնորդված իզոջերմային բազմապատկումը և միկրոչիպերի տեխնոլոգիաները:

ա. Պոլիմերազային շղթայական ռեակցիա (ՊՇՌ)

ՊՇՌ-ն երեք փուլով ընթացող շղթայական գործընթաց է, որը հիմնված է թիրախ ԴՆԹ-ի մենահատուկ հաջորդականության բազմապատկման վրա [30]: ՊՇՌ-ն օգտագործվել է մեծ քանակով սննդային ախտածին բակտերիաների հայտնաբերման համար, ինչպես *Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni, Salmonella spp.* և *Shigella spp.* [31- 35]:

2.1.1 Բազմաբաղադրիչ կամ մուլտիպլեքս ՊՇՌ

Բազմաբաղադրիչ ՊՇՌ-ն բազմաթիվ թիրախային գեների միաժամանակյա բազմապատկման միջոցով թույլ է տալիս իրականացնել ախտածինների ավելի արագ հայտնաբերում սովորական ՊՇՌ-ի համեմատ: Մուլտիպլեքս ՊՇՌ-ի (մ-ՊՇՌ) դեպքում օգտագործվում է պրայմերների մի քանի խումբ: Պրայմերների ձևաչափը շատ կարևոր է մ-ՊՇՌ-ի զարգացման համար, քանի որ բոլոր պրայմերները պետք է ունենան նուկլեինաթթվի շղթային միանալու միևնույն ջերմաստիճանը [28]: Բացի ձևաչափից, կարևոր է պրամերների կոնցենտրացիան: Մ6-ՊՇՌ-ի դեպքում հնարավոր է պրայմերային դիմերների առաջացում, որը բացասաբար է ազդում մեթոդի արդյունավետության վրա: Նշված թերությունը հաղթահարելու համար հարկավոր է պրայմերների բավարար քանակ [28]:

Նախկինում, մ-ՊՇՌ-ն օգտագործվել է միայն 2-3 ախտածին հայտնաբերելու համար: Ներկայումս մ-ՊՇՌ-ն ավելի առաջադեմ է և կարող է միաժամանակ հայտնաբերել մինչև 5 կամ ավել ախտածին:

Հետազոտողների կողմից *Salmonella Enteritidis, Staphylococcus aureus, Shigella flexneri, Listeria monocytogenes*, և *Escherichia coli* O157:H7-ի միաժամանակյա հայտնաբերման հա-

մար իրականացվել է մ-ՊՇՌ 5 զույգ պրայմերների օգտագործմամբ, որոնք թիրախավորել են համապատասխանաբար վարակման համար պատասխանատու սպիտակուցի (*invA*), 16S ռ-ԴՆԹ-ի, վարակման պլազմիդային H հակածնի (*ipaH*), լիստերիոլիզին O-ի (*hlyA*) և ինտիմինի (*eaeA*) գեները [36]:

Զարգացվել է նաև նոր մ-ՊՇՌ մեթոդ, որը հնավարություն է տալիս հայտնաբերել և բարձր ճշգրտությամբ տարբերակել *ListeriaH*–ի 6 տեսակ միաժամանակ միևնույն տարրայում: Այդ 6 տեսակներն են *Listeria monocytogenes, Listeria grayi, Listeria ivanovii, Listeria innocua, Listeria welshimeri* և *Listeria seeligeri*: Հայտնաբերման սահմանը 7.58 × 10^4 գենոմային ԴՆԹ-ի պատճեն է [37]:

Մ-ՊՇՌ-ի հետագա բարելավումը ներառում է նոր GeXP-ՊՇՌ-ի գործարկումը 6 սննդային ախտածինների՝ *Salmonella enterica, Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp. և *Campylobacter jejuni,* միաժամանակյա հայտնաբերման համար տարբեր ոլորտներում, այդ թվում՝ սննդի փորձաքննության ոլորտում [35]:

Գենոմլաբի գենի արտահայտման գենետիկական վերլուծության համակարգը (GeXP) թույլ է տալիս բարձր արտադրողականությամբ հայտնաբերել մի քանի ախտածին բակտերիաներ մեկ ռեակցիայի ընթացքում: Վերլուծության ընթացքը ներառում է պրայմերների ձևավորում (քիմերային պրայմերներ), ՊՇՌ բազմապատկում և ի տարբերություն սովորական ՊՇՌ-ի, ագարոզային գել էլեկտրոֆորեզի փոխարեն օգտագործվում է մազանոթային էլեկտրոֆորեզ: Քիմերային պրայմերները 5′ ծայրին պարունակում են համընդհանուր պիտակով գեն-մենահատուկ հաջորդականություն և օգտագործվում են համընդհանուր պիտակներով ամպլիկոնների արտադրման համար: Համընդհանուր պրայմերները, որոնք պարունակում են քիմերային պրայմերներում օգտագործվող միևնույն համընդհանուր հաջորդականության պիտակները, խթանում են մնացյալ ՊՇՌ ռեակցիաները: Առջևի համընդհանուր պրայմերը 5′ ծայրում կովալենտորեն զոնդավորված է լուսարձակող ներկանյութի հետ և օգտագործվում է մազանոթային էլեկտրոֆորեզի ժամանակ ՊՇՌ արտադրանքների հայտնաբերման համար [35]: Գենոմլաբի գենի արտահայտման գենետիկական վերլուծության համակարգի (GeXP) հայտնաբերման սահմանը *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp. և *Campylobacter jejuniH*–ի համար համապատասխանաբար 420, 310, 270, 93, 85 և 66 ԳԱՄ/մլ է:

2.1.2 Իրական ժամանակի կամ քանակական ՊՇՌ (ք-ՊՇՌ)

Իրական ժամանակի կամ քանակական ՊՇՌ-ն տարբերվում է պարզ ՊՇՌ-ից, քանի որ այն ՊՇՌ արտադրանքների հայտնաբերման համար չի պահանջում ագարոզային գել էլեկտրոֆորեզ: Այս մեթոդն ի վիճակի է շարունակաբար վերահսկել ամբողջ ռեակցիայի ընթացքում ՊՇՌ-ի արտադրանքի ձևավորումը՝ չափելով երկու զոնդերի կամ ԴՆԹ-ում ներկառուցվող ներկանյութերի լուսարձակման ազդանշանը: Այս պարագայում լուսարձակման ուժգնությունը համեմատական է ՊՇՌ-ամպլիկոնների գումարին [38, 28]:

Ք-ՊՇՌ-ի բարելավման համար օգտագործվում են լուսարձակող համակարգեր, այդ թվում՝ SYBR կանաչ, TaqMan զոնդեր և մոլեկուլային փարոսներ: SYBR կանաչը երկշղթա ԴՆԹ-ին կապվող լուսարձակող ներկ է [39]: Սա ոչ մենահատուկ ներկառուցվող ներկանյութ է և տալիս է թույլ լուսարձակում: Լուսարձակումն ուժգնանում է, երբ այն ներկառուցվում է ԴՆԹ-ի երկպարույրի փոքր ակոսում [40-42]:

TaqMan զոնդերը, որոնք հայտնի են նաև որպես երկու ներկ պարունակող զոնդեր, 5′

ծայրում՝ հաղորդող, իսկ 3′ ծայրում մարող լուսարձակող ներկ պարունակող օլիգոնուկլեոտիդներ են [39, 41]: Հաղորդող և մարող ներկերը մոտ են իրար, և դա կանխում է հաղորդող ներկի կողմից լուսարձակումը [41]: TaqMan զոնդը կոմպլեմենտար է ամպլիկոնի շղթաներից որևէ մեկին: Համակարգի աշխատանքը կախված է *Taq* ԴՆԹ պոլիմերազի 5′-3′ էկզոնուկլեազային ակտիվությունից: Լուսարձակման ազդանշանի առաջացման համար նշված ֆերմենտի 5′-3′ էկզոնուկլեազային ակտիվության արդյունքում քայքայում է զոնդերի միջև եղած կապը [43]:

Մոլեկուլային փարոսները մազակալի (կամ հիմք) և օղակի տարածական դասավորվածություն ունեցող օլիգոնուկլեոտիդային զոնդեր են, որոնցում թիրախին կոմպլեմենտար հաջորդականությունը գտնվում է օղակային մասում, իսկ հիմքը կամ մազակալը ստացվում է 2 կոմպլեմենտար հաջորդականությունների միացման հետևանքով: Հաղորդող ներկը միացած է զոնդի մի ծայրին, իսկ մարող զոնդը՝ մյուսին: Ներկերը միմյանց մոտ լինելն ապահովվում է հիմքի շնորհիվ: Այս դեպքում լուսարձակում չի դիտվում [27, 36, 41, 43]:

Մոլեկուլային փարոսները լուսարձակող ազդանշան զոնդն արտադրում են հիբրիդացնելիս: Հիբրիդացման ընթացքում զոնդը ենթարկվում է ինքնաբուխ տարածական փոփոխության, որի շնորհիվ ներկերը միմյանցից առանձնանում են, և արդյունքում դիտվում է լուսարձակում [27, 36, 41, 44]:

Թարմ մրգերի և բանջարեղենի փորձաքննության մեջ մոլեկուլային փարոսների ք-ՊՇՌ-ի միջոցով *Salmonella*-ի հայտնաբերումը iagA գենի թիրախավորմամբ առաջին անգամ հաղորդվել է Լիմինգի և Բհագվաթի կողմից [41,44]: TaqMan և SYBR կանաչ ք-ՊՇՌ-ի նվաճումները թույլ են տալիս նույնականացնել և քանակապես հայտնաբերել *Staphylococcus aureus*-ի էնտերոտոքսինի գենի կլաստեր (egc) պարունակող շտամերը հում կաթնամթերքի փորձաքննության ընթացքում: *Staphylococcus aureus*-ի վերոնշյալ շտամերի հայտնաբերման սահմանը հում կաթնամթերքում SYBR կանաչ ք-ՊՇՌ-ի դեպքում 1×10^3 ԳԱՄ/մլ է, մինչդեռ TaqMan ք-ՊՇՌ-ի դեպքում՝ 1×10^4 ԳԱՄ/մլ [24]: Վերոնշյալ մեթոդներով հայտնաբերվել են նաև *Escherichia coli*-ի շիգա թույն արտադրող O26, O45, O103, O111, O121 և O145 շտամերը աղացած տավարի մսում՝ օգտագործելով շիգա թույների (stx1a և stx2), ինտիմինի (eae) և wzx գեների թիրախային պրայմերներ [40]:

Ք-ՊՇՌ-ի առավելությունների շնորհիվ սննդային ախտածինների (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 և *Campylobacter)* հայտնաբերման համար սկսել են արտադրվել առևտրային կիտեր [45]: *Salmonella*-ի համար նախատեսված կիտերից են *Salmonella* BAX™ PCR (DuPont Qualicon), AnDiaTec® *Salmonella,* իրական ժամանակի ՊՇՌ կիտ (AnDia Tec), Probelia™ *Salmonella* sp., TaqMan™ *Salmonella* [45-47]:

բ. Նուկլեինաթթվային հաջորդականության վրա հիմնված ամպլիֆիկացիա (բազմապատկում)

Նուկլեինաթթուների հաջորդականության վրա հիմնված ամպլիֆիկացումը (ՆՀԱ) մշակվել է Կոմպտոնի կողմից 1990-ականներին: Նշված մեթոդում նուկլեինաթթուները ամպլիֆիկացվում են հաստատուն ջերմաստիճանի (իզոթերմային) պայմաններում, ի տարբերություն ՊՇՌ-ի, որը իրականացվում է տարբեր ջերմաստիճաններում [48]: ՆՀԱ-ի օգնությամբ միաշղթա ՌՆԹ-ն հակադարձ տրանսկրիպտազ ֆերմենտի շնորհիվ փոխակերպվում է կոմպլեմենտար ԴՆԹ-ի: Ռեակցիան ընթանում է 41 ^{0}C–ում 2 մենահատուկ պրայմերների և 3 ֆերմենտերի միջոցով (թռչունների միելոբլաստոզի վիրուսի հակադարձ տրանսկրիպտազ, T7 ՌՆԹ պոլիմերազ և ՌՆԹազ H): ՆՀԱ-ի արդյունքում ստացված արտադրանքները հայտնաբերվում են ագարոզային

գել էլեկտրոֆորեզի կամ ֆերմենտային գելերի մեթոդով, որոնք համարվում են աշխատատար և ծախսատար [27, 35]: Նշված հանգամանքը խթանել է մեկ այլ տեսակի իրական ժամանակի ՆՀԱ-ի ստեղծմանը, որում օգտագործվում են զոնդեր: Լուսարձակող զոնդերը թույլ են տալիս հայտնաբերել միաշղթա ՌՆԹ-ի ամպլիկոնները [27]: Իրական ժամանակի ՆՀԱ-ն օգտագործվել է սննդային ախտածինների բացահայտման համար, ինչպիսիք են *Salmonella enterica, Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni*, և *Campylobacter coli* [23, 49-51]: Ավելին, իրական ժամանակի ՆՀԱ-ն ունակ է հայտնաբերել կենսունակ մանրէները, քանի որ ՌՆԹ ամպլիկոնների առկայությունը հաստատում է կենսունակ բջիջների առկայությունը [49]: Իրական ժամանակի ՆՀԱ-ն օգտագործվել է կենսունակ և ոչ կենսունակ բջիջների տարբերակելու համար: Նախքան մահացած բջիջներից նուկլեինաթթուների անջատումը, թիրախային մ-ՌՆԹ-ի քայքայման համար անհրաժեշտ է ՌՆԹազով մշակել բջիջները կամ էլ նմուշները մշակել ՌՆԹազից զուրկ ԴՆԹազով [52-54]: Life Sciences, KIT Biomedical Research, Gen-Probe և bioMérieux-ի կողմից մշակվել են բազմաթիվ առևտրային կիտեր [24]: Nuclisens EasyQ® Basic կիտը կարող է օգտագործվել *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* և *Vibrio* cholera-ի հայտնաբերման համար [23, 24, 53]:

Սննդի փորձաքննության մեջ մանրէների կուլտիվացման վրա հիմնված մեթոդները ընտրողական են, բայց դրանք ժամանակատար են և աշխատատար: Հետևաբար, տարբեր ոլորտներում, այդ թվում նաև սննդի և ջրի փորձաքննության ոլորտում, մշակվել են արագ հայտնաբերման մեթոդներ, որպեսզի հնարավոր լինի հաղթահարել վաղուց կիրառվող մեթոդների սահմանափակումները: Արագ հայտնաբերման մեթոդներն ավելի զգայուն, ժամանակ խնայող, ոչ աշխատատար և հավաստի են մանրէների կուլտիվացման վրա հիմնված մեթոդների համեմատ:

Անցած մի քանի տարիների ընթացքում միկրոսարքերի արտադրության նվաճումների շնորհիվ իրականացվել են դիմադրության չափման վրա հիմնված կենսասենսորների չափերի կոմպակտացում դեպի չիպային ձևաչափ, որն առաջարկում է նոր հնարավորություններ մանրէների հայտնաբերման ոլորտում: Միկրոէլկեկտրոդային համակարգերը թույլ են տալիս էլեկտրոդային մակերեսներին կապվել բակտերիալ մենահատուկ բջիջների հետ: Արդյունքում դիտվում են մենահատուկ կենսաճանաչման ռեակցիաներ, որի շնորհիվ այս մեթոդը հնարավորություն է տալիս տարբեր բակտերիալ խմբերից հայտնաբերել որոշակի խումբ, նույնիսկ բարդ խմբավորումների առկայության պայմաններում:

Շատ հաճախ սննդային փորձաքննություններում էական է հետազոտության արդյունքների ստացման տևողությունը, հատկապես զանգվածային թունավորման դեպքում: Այս տեսանկյունից կարևոր է նոր, ավելի արագ իրականացվող մեթոդների կիրառումը, ինչպիսիք են ԴՆԹ-ի անջատման կիտերի վրա հիմնված իրական ժամանակի ՊՇՌ մեթոդը և նուկլեինաթթուների հաջորդականության վրա հիմնված ամպլիֆիկացումը(ՆՀԱ):

Նուկլեինաթթուների վրա հիմնված մեթոդները, ինչպես ՊՇՌ, բազմաբաղադրիչ ՊՇՌ, քանակական ՊՇՌ, և նուկլեինաթթուների հաջորդականության վրա հիմնված ամպլիֆիկացումը ունեն բարձր զգայունություն, սակայն այս մեթոդները պահանջում են համապատասխան գիտելիքներով ու հմտություններով զինված անձնակազմ և մենահատուկ սարքավորումներ: Այսինքն, նշված մեթոդների հիմնական սահմանափակումը՝ ծախսատար լինելն է:

Այսպիսով, ի մի բերելով և վերլուծելով տարբեր հեղինակների կողմից նկարագրված ախտածին բակտերիաների հայտնաբերման մեթոդները, բարձր արդյունավետություն ապահովելու նկատառումից ելնելով՝ առաջարկվում է Հայաստանի Հանրապետությունում իրականացվող սննդամթերքի և խմիչքների մանրէաբանական փորձաքննությունների ընթացքում ևս կիրառել

վերը նշված արագ հայտնաբերման մեթոդները:

Գրականության ցանկ

1. Pathatrix® Auto System. Available online: http://www.lifetechnologies.com/cn/zh/home/ industrial/ food-safety/pathatrix-auto-system.html (accessed on 24 February 2014).
2. De Lorenzis, E.; Manera, M.G.; Cimaglia, F.; Montagna, G.; Chiesa, M.; Poltronieri, P.; Santino, A.; Rella, R. SPR based immunosensor for detection of Legionella pneumophila in water samples. Optics Comm. 2013, 294, 420–426.
3. https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/salmonella-food.html
4. Poltronieri, P.; de Blasi, M.D.; D'Urso, O.F. Detection of Listeria monocytogenes through RealTime PCR and biosensor methods. Plant Soil Environ. 2009, 9, 363–369.
5. D'Urso, O.F.; Poltronieri, P.; Marsigliante, S.; Storelli, C.; Hernandez, M.; Rodriguez Lazaro, D. A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in food samples. Food Microbiol. 2009, 26, 311–316.
6. Kuang, H.; Cui, G.; Chen, X.; Yin, H.; Yong, Q.; Xu, L.; Peng, C.; Wang, L.; Xu, C. A one-step homogeneous sandwich immunosensor for Salmonella detection based on magnetic nanoparticles (MNPs) and quantum dots (QDs). Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 8603–8610.
7. Amaya-González, S.; de-los-Santos-Alvarez, N.; Miranda-Ordieres, A.J.; Lobo-Castañón, M.J. Aptamer-based analysis: A promising alternative for food safety control. Sensors 2013, 13, 16292–16311. 8.
8. Paniel, N.; Baudart, J.; Hayat, A.; Barthelmebs, L. Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples. Methods 2013, 64, 229–240.
9. Dutt, S.; Tanha, J.; Evoy, S.; Singh, A. Immobilization of P22 bacteriophage Tailspike protein on Si surface for optimized Salmonella capture. J. Anal. Bioanal. Tech. 2013, S7, 7.
10. Liana, D.D.; Raguse, B.; Gooding, J.J.; Chow, E. Recent advances in paper-based sensors. Sensors 2012, 12, 11505–11526.
11. Bergwerff, A.A.; van Knapen, F. Surface plasmon resonance biosensors for detection of pathogenic microorganisms: Strategies to secure food and environmental safety. *J. AOAC Int.* 2006, *89*, 826–831.
12. De Lorenzis, E.; Manera, M.G.; Cimaglia, F.; Montagna, G.; Chiesa, M.; Poltronieri, P.; Santino, A.; Rella, R. SPR based immunosensor for detection of Legionella pneumophila in water samples. Optics Comm. 2013, 294, 420–426.
13. Li, N.; Brahmendra, A.; Veloso, A.J.; Prashar, A.; Cheng, X.R.; Hung, V.W.S.; Guyard, C.; Terebiznik, M.; Kerman, K. Disposable immunochips for the detection of *Legionella pneumophila* using electrochemical impedance spectroscopy. *Anal. Chem.* 2012, *84*, 3485–3488.
14. Silley, P.; Forsythe, S. Impedance microbiology—A rapid change for microbiologists. *J. Appl. Bacteriol.* 1996, *80*, 233–243.
15. Wawerla, M.; Stollem, A.; Schalchm, B.; Eisgruber, H. Impedance microbiology: Applications in food hygiene. *J. Food Prot.* 1999, *62*, 1488–1496.
16. Wan, Y.; Lin, Z.; Zhang, D.; Wang, Y.; Hou, B. Impedimetric immunosensor doped with reduced graphene sheets fabricated by controllable electrodeposition for the non-labelled detection of bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 2011, *26*, 1959–1964.
17. Yang, L.; Ruan, C.; Li, Y. Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosens. Bioelectron.* 2003, *19*, 495–502.
18. Yang, L.; Li, Y.; Griffis, C.L.; Johnson, M.G. Interdigited microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. *Biosens. Bioelectron.* 2004, *19*, 1139–1147.
19. Ruan, C.; Yang, L.; Li, Y. Immunobiosensor chips doe detection of *Escherichia coli* O157:H7 using electrochemical impedance spectroscopy. *Anal. Chem. 2002, 74,* 4814–4820.
20. Yang, L.; Li, Y.; Erf, G.F. Interdigitated array microelectrode-based electrodechemical impedance

immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Chem.* 2004, *76*, 1107–1113.
21. Radhakrishnan, R.; Jahne, M.; Rogers, S.; Suni, I. Detection of *Listeria monocytogenes* by electrochemical impedance spectroscopy. *Electroanalysis* 2013, *25*, 2231–2237.
22. Wang, R.; Dong, W.; Ruan, C.; Kanayeva, D.; Tian, R.; Lassiter, K.; Li, Y. TiO2 nanowire bundle microelectrode based impedance immunosensor for rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes*. *Nano Lett.* 2008, *9*, 2625–2631.
23. Fykse, E. M., Skogan, G., Davies,W., Olsen, J. S., and Blatny, J.M. (2007). Detection of Vibrio cholerae by real-time nucleic acid sequence-based amplification. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1457–1466. doi: 10.1128/AEM.01635-06.
24. Gracias, K. S., andMcKillip, J. L. (2007). Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in molecular bacteriology: a procedural guide. J. Rapid Meth. Aut. Mic. 15, 295–309. doi: 10.1111/j.1745-4581.2007.00099.x.
25. Kuang, H.; Cui, G.; Chen, X.; Yin, H.; Yong, Q.; Xu, L.; Peng, C.; Wang, L.; Xu, C. A one-step homogeneous sandwich immunosensor for Salmonella detection based on magnetic nanoparticles (MNPs) and quantum dots (QDs). Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 8603–8610.
26. Lee, L. H., Cheah, Y. K., Noorzaleha, A. S., Sabrina, S., Sim, J. H., Khoo, C. H., et al. (2008). Analysis of Salmonella Agona and Salmonella Weltevreden in Malaysia by PCR fingerprinting and antibiotic resistance profiling. Antonie Van Leeuwenhoek 94, 377–387. doi: 10.1007/s10482-008-9254-y.
27. Leone, G., van Schijndel, H., van Gemen, B., Kramer, F. R., and Schoen, C. D. (1998). Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. Nucleic Acids Res. 26, 2150–2155. doi: 10.1093/nar/26.9.2150.
28. Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., and Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. J. Microbiol. Biotechn. 24, 297–312. doi: 10.4014/jmb.1310.10013.
29. Adzitey, F., Rusul, G., Huda, N., Cogan, T., and Corry, J. (2012). Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of Campylobacter species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. Int. J. Food Microbiol. 154, 197–205. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.006.
30. Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., and Pal, U. K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. Am. J. Food. Technol. 6, 87–102. doi: 10.3923/ajft.2011.87.102.
31. Cheah, Y. K., Noorzaleha, A. S., Lee, L. H., Radu, S., Sukardi, S., and Sim, J. H. (2008). Comparison of PCR fingerprinting techniques for the discrimination of Salmonella enterica subsp. enterica se rovar Weltevreden isolated from indigenous vegetables in Malaysia. World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 327–335. doi: 10.1007/s11274-007-9474-8.
32. Lee, L. H., Cheah, Y. K., Noorzaleha, A. S., Sabrina, S., Sim, J. H., Khoo, C. H., et al. (2008). Analysis of Salmonella Agona and Salmonella Weltevreden in Malaysia by PCR fingerprinting and antibiotic resistance profiling. Antonie Van Leeuwenhoek 94, 377–387. doi: 10.1007/s10482-008-9254-y.
33. Alves, J., Marques, V. V., Pereira, L. F. P., Hirooka, E. Y., and Moreira de Oliveira, T. C. R. (2012). Multiplex PCR for the detection of Campylobacter spp. and Salmonella spp. in chicken meat. J. Food Safety 32, 345–350. doi: 10.1111/j.1745-4565.2012.00386.x.
34. Chiang, Y. C., Tsen, H. Y., Chen, H. Y., Chang, Y. H., Lin, C. K., Chen, C. Y., et al. (2012). Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Enterobacter sakazakii, Escherichia coli O157:H7, Vibrio parahaemolyticus, Salmonella spp. and Pseudomonas fluorescens in milk and meat samples. J. Microbiol. Meth. 88, 110–116. doi: 10.1016/j.mimet.2011.10.021.
35. Zhou, B., Xiao, J., Liu, S., Yang, J., Wang, Y., Nie, F., et al. (2013). Simultaneous detection of six food-borne pathogens by multiplex PCR with GEXP analyzer. Food Cont. 32, 198–204. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.044.
36. Chen, J., Tang, J., Liu, J., Cai, Z., and Bai, X. (2012). Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. J. Appl. Microbiol. 112, 823–830. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05240.x.

37. Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., et al. (2013). Simultaneous detection of Listeria species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. Food Cont. 32, 659–664. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.048.
38. Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., and Magnani, M. (2009). A new platform for real-time PCR detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157 in milk. Food Microbiol. 26, 615–622. doi:10.1016/j.fm.2009.04.008.
39. Patel, J. R., Bhagwat, A. A., Sanglay, G. C., and Solomon, M. B. (2006). Rapid detection of Salmonella from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. Food Microbiol. 23, 39–46. doi:10.1016/j.fm.2005.01.011.
40. Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Cray Jr, W. C., Narang, N., Yan, X., Medina, M., et al. (2011). Detection by multiplex real-time polymerase chain reaction assays and isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli serogroups O26, O45, O103, O111, O121 and O145 in ground beef. Foodborne Pathog. Dis. 8, 601–607. doi:10.1089/fpd.2010.0773.
41. Levin, R. E. (2005). The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. Food Biotechnol. 18, 97–133. doi: 10.1081/FBT-120030386.
42. Singh, J., Batish, V. K., and Grover, S. (2009). A molecular beacon-based duplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in milk and milk products. Foodborne Pathog. Dis. 6, 1195–1201. doi: 10.1089/fpd.2009.0310.
43. Patel, J. R., Bhagwat, A. A., Sanglay, G. C., and Solomon, M. B. (2006). Rapid detection of Salmonella from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. Food Microbiol. 23, 39–46. doi:10.1016/j.fm.2005.01.011.
44. Liming, S. H., and Bhagwat, A. A. (2004). Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect Salmonella species contaminating fruits and vegetables. Int. J. Food Microbiol. 95, 177–187. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.013.
45. Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., and Pal, U. K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. Am. J. Food. Technol. 6, 87–102. doi: 10.3923/ajft.2011.87.102.
46. Maciorowski, K. G. (2005). Polymerase chain reaction detection of foodborne Salmonella spp. in animal feeds. Crit. Rev. Microbiol. 31, 45–53. doi:10.1080/10408410590912970.
47. Park, S. H., Aydin, M., Khatiwara, A., Dolan, M. C., Gilmore, D. F., Bouldin, J. L., et al. (2014). Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of Salmonella in poultry and poultry products. Food Microbiol.38, 250–262. doi: 10.1016/j.fm.2013.10.002.
48. Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350, 91–92. doi: 10.1038/350091a0.
49. Simpkins, S. A., Chan, A. B., Hays, J., Popping, B., and Cook, N. (2000). An RNA transcription-based amplification technique (NASBA). for the detection of viable Salmonella enterica. Lett. Appl. Microbiol. 30, 75–79. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00670.x.
50. Churruca, E., Girbau, C., Martinez, I., Mateo, E., Alonso, R., and Fernandez- Astorga, A. (2007). Detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in chicken meat samples by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacons. Int. J. Food Microbiol. 117, 85–90. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.007.
51. O'Grady, J., Lacey, K., Glynn, B., Smith, T. J., Barry, T., and Maher, M. (2009).tmRNA-a novel high-copy-number RNA diagnostic target-its application for Staphylococcus aureus detection using real-time NASBA. FEMS Microbiol. Lett.301, 218–223. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01822.x.
52. Blais, B. W., Turner, G., Sooknanan, R., and Malek, L. T. (1997). A nucleic acid sequence-based amplification system for detection of Listeria monocytogenes hlyA sequences. Appl. Eviron. Microbiol. 63, 310–313.
53. Nadal, A., Coll, A., Cook, N., and Pla, M. (2007). A molecular beacon-based real time NASBA assay for detection of Listeria monocytogenes in food products: role of target mRNA secondary structure on NASBA design. J. Microbiol. Meth. 68, 623–632. doi: 10.1016/j.mimet.2006.11.011.

54. Dwivedi, H. P., and Jaykus, L. A. (2011). Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. Crit. Rev. Microbiol. 37, 40–63. doi:10.3109/1040841X.2010.506430.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ БЫСТРОГО ОБНАРУЖЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНТАМИНАЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭКСПЕРТИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Николян С. Г., Цаканян А. В. Андреасян Н.А.

Статья посвящена актуальной на сегодняшний день проблеме продовольственной безопасности, которая имеет жизненно важное значение. В статье речь идет о продуктах питания, содержащие питательные вещества, витамины, минералы, необходимые для жизнедеятельности организма человека, которые при несоблюдении правил безопасности, являются источником различных патогенных (болезнетворных) бактерий. Отмечается, что помимо возбудителей различных заболеваний, непосредственно угрожающих здоровью человека, патогенные бактерии могут приводить к пищевым отравлениям путем употребления контаминированных продуктов питания, и поэтому, безусловно, экспертизы пищевых продуктов важны для поддержания здоровья населения.

В статье значительное внимание уделяется определению показателей безопасности продуктов питания, в частности микробиологических, которые являются неотъемлемой частью экспертизы. Подчеркнута важность индивидуального подхода по определению специфичных бактериологических параметров, которые устанавливаются и нормируются Техническими регламентами Таможенного союза, регулирующими производственную сферу данного продукта.

В статье рассматриваются характерные признаки обнаружения и количественного определения микроорганизмов, регламентируемых нормативными документами. Излагается взгляд на то, что исследование образцов пищевых продуктов производилось и производится методом подсчета колоний, выросших на селективных питательных средах. Отмечается, что данный метод считается «золотым стандартом», сертифицирован Международной организацией стандартизации (ISO), лежит в основе ряда международных методик (ISO 4831:2006, ISO 6579-1:2017, ISO 6888-2:2021, ISO 4833-2:2013) и является довольно точным, хотя длительным и трудоемким.

Обосновывается мысль о том, что при выполнении ряда пищевых экспертиз, сроки получения результатов исследований имеют решающее значение, в частности, в случаях массового отравления, и поэтому актуально использование новых, наиболее быстрых методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени на основе набора реагентов для выделения ДНК, амплификация последовательности нуклеиновых кислот (МАНК) и т.д.

Ключевые слова: *микробиологическое исследование продуктов питания, биосенсоры, патогенные бактерии, полимеразная цепная реакция.*

GENERAL CHARACTERISTIC OF RAPID DETECTION METHODS OF MICROBIOLOGICAL CONTAMINATIONS IN CONDUCTION OF FOOD PRODUCTS EXPERTISE

Nikolyan S., Tsakanyan A.V, Andreasyan N.A.

The article is concerned with actual problem of food security which is of vital importance. The article deals with food products containing nutrients, vitamins, minerals necessary for the life activity of the human body, which, if safety rules are not followed, are a source of various pathogenic (disease-causing) bacteria. It is noted that in addition to the causative agents of various diseases that directly threaten human health, pathogenic bacteria can lead to food poisoning through the consumption of contaminated food, and therefore, of course, food expertise is important for maintaining public health.

The article pays considerable attention to the determination of food safety indicators, in particular microbiological ones, which are an integral part of the expertise. The importance of an individual approach to the determination of specific bacteriological parameters, which are established and standardized by the Technical Regulations of the Customs Union, regulating the production area of this product, was emphasized.

The article discusses the characteristic features of the detection and quantitative determination of microorganisms, regulated by regulatory documents. The view is stated that the study of food samples was and is being carried out by the method of counting colonies grown on selective nutrient media. It is noted that this method is considered the "gold standard", certified by the International Organization for Standardization (ISO), and forms the basis of a number of international methods (ISO 4831: 2006, ISO 6579-1: 2017, ISO 6888-2: 2021, ISO 4833-2: 2013), and is fairly accurate, albeit time consuming and laborious.

The idea is substantiated that when performing a number of food examinations, the timing of obtaining research results is of decisive importance, in particular, in cases of mass poisoning, and therefore the use of new, most rapid methods, such as real-time polymerase chain reaction (PCR) based on DNA isolation reagent kit, nucleic acid sequence amplification (NAA), etc. vital.

Key words: *the examination of the microscopic organisms in food, pathogenic bacteria, polymerase chain reaction.*

Ներկայացվել է խմբագրության 25.08.2021
Ընդունվել է տպագրության 18.11.2021