



УДК 61:575.1.577.21[543.054:543.635.28]

Використання молекулярно-біологічних методів досліджень у прикладних галузях ветеринарних наук

Б.І. Назар¹, С.Д. Мурська¹, Д.Ф. Гуфрій², Б.В. Гутій²
bobnaz@ukr.net

¹Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна;

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

У статті висвітлено інформацію про використання невеликої кількості молекулярних методів дослідження в прикладних галузях ветеринарних наук. Також розглянуто основні підходи та напрямки в роботі сектору молекулярно-біологічних досліджень ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Об'єктами досліджень молекулярної біології являються конкретні макромолекули – насамперед білки та нуклеїнові кислоти, найпростіші форми живого – ізольовані клітини, ядра, органіди клітин, хромосоми, віруси та бактерії. Застосування генної технології для аналізу якості харчових продуктів для людей та кормів для тварин зумовлено потребою в чутливому, швидкому та точному методі. Поширеним є використання методу ПЛР для індикації та ідентифікації збудників харчових токсикоінфекцій. На основі ПЛР розроблено методи для аналізу продуктів, що виготовлені за використання трансгенних мікроорганізмів. Актуальним використанням ПЛР є визначення антибіотикорезистентності клінічних штамів збудників інфекційних захворювань, створення можливості кількісного обліку результатів для контролю динаміки інфекційного процесу, правильного вибору тактики лікування і оцінки ефективності застосовуваних лікувальних засобів. Важливим напрямом використання ДНК-технологій є виявлення продуктів, отриманих після використання генно-інженерних методів. Таким чином, за допомогою молекулярно-біологічних методів досліджень сектор молекулярно-біологічних досліджень може виконувати такі завдання: виявлення, ідентифікація та кількісне визначення вмісту генетично модифікованих організмів; ідентифікація видової приналежності білків тваринного походження в преміксах, кормових добавках та кормах для тварин; проведення моніторингових досліджень вмісту генетично модифікованих організмів та ДНК жуйних в преміксах, кормових добавках та кормах для тварин згідно зі щорічним Планом моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів; в перспективі діагностування інфекційних (бактерій) та паразитарних збудників у сільськогосподарських тварин та визначення антибіотикорезистентності клінічних штамів збудників інфекційних захворювань.

Ключові слова: молекулярні методи досліджень, метод ПЛР, видова диференціація білків тваринного походження, генетично модифіковані організми, трансгенні мікроорганізми.

Использование молекулярно-биологических методов исследования в прикладных областях ветеринарных наук

Б.И. Назар¹, С.Д. Мурська¹, Д.Ф. Гуфрий², Б.В. Гутый²
bobnaz@ukr.net

¹Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

²Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

Citation:

Nazar, B., Murska, S., Gufrij, D., Gutij, B. (2017). The use of molecular biological research methods in applied fields of veterinary science. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 19(77), 166–169.

В статье освещено информацию об использовании небольшого количества молекулярных методов исследования в прикладных областях ветеринарных наук. Также рассмотрены основные подходы и направления в работе сектора молекулярно-биологических исследований ГНИКИ ветпрепаратов и кормовых добавок. Объектами исследований молекулярной биологии являются конкретные макромолекулы – в первую очередь белки и нуклеиновые кислоты, простые формы живого – изолированные клетки, ядра, органоиды клеток, хромосомы, вирусы и бактерии. Применение генной технологии для анализа качества пищевых продуктов для людей и кормов для животных обусловлено потребностью в чувствительном, быстром и точном методе. Распространенным является использование метода ПЦР для индикации и идентификации возбудителей пищевых токсикоинфекций. На основе ПЦР разработаны методы для анализа продуктов, изготовленных за использование трансгенных микроорганизмов. Актуальным использованием ПЦР является определение антибиотикорезистентности клинических штаммов возбудителей инфекционных заболеваний, создание возможности количественного учета результатов для контроля динамики инфекционного процесса, верного выбора тактики лечения и оценки эффективности применяемых лекарственных средств. Важным направлением использования ДНК-технологий является выявление продуктов, полученных после использования генно-инженерных методов. Таким образом, с помощью молекулярно-биологических методов исследований сектор молекулярно-биологических исследований может выполнять следующие задачи: выявление, идентификация и количественное определение содержания генетически модифицированных организмов; идентификация видовой принадлежности белков животного происхождения в премиксах, кормовых добавках и кормах для животных; проведения мониторинговых исследований содержания генетически модифицированных организмов и ДНК жвачных в премиксах, кормовых добавках и кормах для животных согласно ежегодного Плана мониторинга кормов, кормовых добавок и премиксов; в перспективе диагностирования инфекционных (бактерий) и паразитарных возбудителей в сельскохозяйственных животных и определения антибиотикорезистентности клинических штаммов возбудителей инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: молекулярные методы исследований, метод ПЦР, видовая дифференциация белков животного происхождения, генетически модифицированные организмы, трансгенные микроорганизмы.

The use of molecular biological research methods in applied fields of veterinary science

B. Nazar², S. Murska¹, D. Gufrij², B. Gutyj²
bobnaz@ukr.net

¹State Research Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives
Donetska str., 11, Lviv, 79019, Ukraine;

²Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj
Pekarska str., 50, Lviv, 79010, Ukraine

The article deals with the information on the use of small amounts of molecular research methods in applied fields of veterinary science. Is also considered the main approaches and directions in the sector work of molecular biological research GNIKI of veterinary medicines and feed additives. The objects of researches of molecular biology are specific macromolecule – especially proteins and nucleic acids, the simplest form of living – isolated cell nucleus, organelles of cells, chromosomes, viruses and bacteria. The use of gene technology to analyze food quality for people and feeding stuffs for animal is due to the need for sensitive, rapid and accurate method. Using the PCR method is common for indication and identification of the causative agents of food poisoning. Based on the PCR it was developed methods for analyzing the products, which were made for the use of transgenic microorganisms. The actual use of the PCR is the determination of clinical strains antibiotic resistance of infectious diseases, creating the possibility of quantifying results account to control the dynamics infectious process, the correct choice of treatment and evaluating the effectiveness of used medicines. An important direction of the application of DNA technology is to identify products obtained after using genetic engineering techniques. Thereby, by means of molecular biological research methods the sector of molecular biological studies can perform the following tasks: detection, identification and quantification of the content of genetically modified organisms; identification of plant species of animal protein in premixes, fodder additives and animal feed; conducting monitoring investigations the content of genetically modified organisms and ruminant DNA in premixes, feed additives and animal nutrition according to an annual monitoring plan of feed, feed additives and premixes; in the future diagnosing infectious (bacteria) and parasitic exciter in farm animals and determination of antibiotic resistance in clinical strains of infectious diseases.

Key words: molecular research methods, PCR, species differentiation of animal protein, genetically modified organisms, transgenic microorganisms.

Вступ

Молекулярні методи досліджень набувають дедалі більшої популярності у прикладних галузях ветеринарних наук (Ashmarin, 1977; Osterman, 2002). Низка дисциплін аграрного профілю, такі як селекція, мікробіологія, вірусологія, епізоотологія, ветеринарно-санітарна експертиза, клінічна діагностика та ін. вже не можуть обходитись без молекулярного «підтвердження» своїх розробок і технологій.

Сьогодні можна виділити кілька основних напрямів у розробленні аграрних ДНК-технологій:

- дослідження геному сільськогосподарських тварин на наявність продуктивних якостей для вирішення селекційних проблем (MAS – *marker assisted selection* – селекція за допомогою маркерів);

- виявлення генетичних захворювань на ранніх стадіях розвитку;

- діагностика інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин і проведення епізоотологічного моніторингу;
- генетична «дактилоскопія» організмів, створення генетичних паспортів порід, видів, таксономічних груп;
- визначення статі ембріонів;
- контроль якості сільськогосподарської сировини і продуктів харчування.

Деякі із наведених напрямів не лише достатньою мірою розроблено, а й упроваджено в практику аграрних технологій, інші – перебувають на стадії наукової розробки і апробації.

Результати та їх обговорення

На початку 2017 року в ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок створено сектор молекулярно-біологічних досліджень. Об'єктами досліджень молекулярної біології є конкретні макромолекули – насамперед білки та нуклеїнові кислоти, найпростіші форми живого – ізольовані клітини, ядра, органоїди клітин, хромосоми, віруси та бактерії.

Застосування генної технології для аналізу якості харчових продуктів для людей та кормів для тварин зумовлено потребою в чутливому, швидкому та точному методі. Поширеним є використання методу ПЛР для індикації та ідентифікації збудників харчових токсикоінфекцій. Традиційні мікробіологічні підходи до виявлення та ідентифікації бактерій у харчових продуктах потребують гомогенізації зразків у спеціальному буфері, інкубації культури на селективному та диференціальному середовищах, дослідження колоній мікроскопічними, біохімічними чи імунологічними методами, тобто вимагають значних витрат часу (2–5 діб). За використання ДНК-технологій результати можуть бути отримані упродовж 1–2 днів. Нині вже відпрацьовано методи виявлення сальмонели, кишкової палички, лістерії. У ряді країн (США, Німеччина, Франція) ці методи є офіційними методами у дослідженнях харчових продуктів.

Відносно новим напрямом використання ДНК-технологій у практиці тваринництва є видова диференціація білків тваринного походження у харчових продуктах і кормах, які піддавались термічній обробці. Значення цього напрямку суттєво зросло у зв'язку з виявленням пріонних захворювань у сільськогосподарських та домашніх тварин.

Складність визначення видової приналежності білка полягає в тому, що корми, які піддавались термічній обробці (м'ясо-кісткове борошно, рибне борошно, гранульовані комбікорми, сухі і консервовані корми для котів і собак), містять денатуровані білки, що повністю втратили видову специфічність. Такі методи, як імунодифузія у гелі, ізоелектричне фокусування, що використовують для видової ідентифікації сирого м'яса, у цьому випадку непридатні. Використання РІД не дає змоги визначити видову належність білків тваринного походження уже після термічної обробки за 80 °С протягом 30 хв. Тимчасом за допомогою молекулярно-генетичних методів, зокрема ПЛР, можна виявити 1% свинини, яка піддавалась

термічній обробці за температури 120 °С протягом 10 хвилин після 30 циклів ампліфікації і 0,1% – через 35.

Нині розроблено тест-систему для визначення видової приналежності м'ясних інгредієнтів у кормах і рибному борошні методом ПЛР, яка дає змогу виявити домішки м'ясного борошна з масовою часткою 0,1% у складі рибного борошна, визначити видову приналежність тканин жуйних тварин у комбікормах для сільськогосподарських тварин і птиці, сухих і консервованих кормах для домашніх тварин, сирих м'ясних продуктах і продуктах, які піддавались кулінарній обробці.

На основі ПЛР розроблено методи для аналізу продуктів, що виготовлені за використання трансгенних мікроорганізмів. Вже відпрацьовано методи виявлення генетично модифікованої культури *Lactobacillus curvatus*, яку використовують у складі закваски для ферментації у ковбасному виробництві, та культури *Streptococcus thermophilus*, яку використовують у складі закваски під час виробництва йогуртів.

Сфера застосування ДНК-технологій у рослинництві така ж широка, як і для сільськогосподарських тварин. Нині виділяють такі основні напрями використання ПЛР у генетико-селекційних дослідженнях:

- визначення філогенетичних зв'язків між дикими та культурними видами рослин;
- класифікація селекційного матеріалу;
- ідентифікація генотипів;
- маркування стійкості до хвороб і шкідників;
- картування геному;
- аналіз якості продуктів рослинного походження.

Важливим напрямом використання ДНК-технологій є виявлення продуктів, отриманих після використання генно-інженерних методів. Найбільшою мірою це стосується продуктів рослинного походження, оскільки отримання трансгенних тварин, незважаючи на майже 20-річний досвід людства у їх конструюванні, залишається високовартісною процедурою. Загалом генетично модифікованими були приблизно 70 різних видів рослин. Це сприяє зменшенню на 25% внесення гербіцидів, на 5–10% – підвищенню врожайності культур. Хоча конкретних прикладів серйозної екологічної небезпеки трансгенних сортів і гібридів у природному середовищі не виявлено, їх потенційна небезпека очевидна. Прогнози будуються наразі не на фактичних даних, а на основі загальнобіологічних закономірностей.

Харчові продукти, виготовлені за використання генно-інженерних підходів, поділяються на 3 категорії:

- 1) харчові продукти та харчові інгредієнти, які містять в собі генетично модифіковані організми;
- 2) харчові продукти та харчові інгредієнти, виготовлені із ГМО;
- 3) харчові добавки чи ферменти, виготовлені з допомогою генних технологій. Відповідно до вимог Європейських правил, такі продукти повинні мати спеціальне маркування.

Простота, велика чутливість, висока відтворюваність сприяли швидкому перетворенню методу полімеразної ланцюгової реакції в один із найбільш зруч-

них і перспективних для діагностування інфекційних та паразитарних збудників у сільськогосподарських тварин. Перелік бактерій і паразитарних збудників, для виявлення яких уже готові ПЛР-набори чи компоненти до таких наборів, нині значний. Фахівцями ветеринарної медицини розроблено тест-системи для діагностики великої кількості захворювань серед них такі як кампілобактеріоз, хламідіоз, токсоплазмоз тварин, сальмонельоз, стафілококоз, мікоплазмоз та інші.

Актуальним використанням ПЛР є визначення антибіотикорезистентності клінічних штамів збудників інфекційних захворювань, створення можливості кількісного обліку результатів для контролю динаміки інфекційного процесу, правильного вибору тактики лікування і оцінки ефективності застосовуваних лікувальних засобів.

Висновки

Таким чином, за допомогою молекулярно-біологічних методів досліджень сектор молекулярно-біологічних досліджень може виконувати такі завдання:

- Виявлення, ідентифікація та кількісне визначення вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО).

- Ідентифікація видової приналежності білків тваринного походження в преміксах, кормових добавках та кормах для тварин.

- Проведення моніторингових досліджень вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) та ДНК

жуйних в преміксах, кормових добавках та кормах для тварин згідно зі щорічним Планом моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів.

- Валідація та верифікація методів лабораторних досліджень відповідно до рішення європейської комісії 657/2002 та інших національних і міжнародних вимог.

- Розробка та видання наукових та науково-методичних праць.

- Участь у раундах професійного тестування як на міжнародному рівні – FAPAS, так і на національному рівні.

- Проведення арбітражних досліджень на визначення ГМО та ДНК тваринного походження.

- В перспективі діагностування інфекційних (бактерій) та паразитарних збудників у сільськогосподарських тварин та визначення антибіотикорезистентності клінічних штамів збудників інфекційних захворювань.

Бібліографічні посилання

Ashmarin, I.P. (1977). Molekuljarnaja biologija. Izdatel'stvo Leningradskogo Universiteta. Leningrad (in Russian).

Osterman, L.A. (2002). Metody issledovanija belkov i nukleinovyh kislot. M.: MCNMO (in Russian).

PCR technology: principle and applications for DNA amplification; ed. H.Erlich. New York: W.H. Freeman and Company, 1992.

Стаття надійшла до редакції 30.03.2017