

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ЄФІМОВА ОЛЬГА МИКОЛАЇВНА

УДК 619:614.31:637.075:579.842.1/2

**НАУКОВО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ МЕТОДУ
ВИЗНАЧЕННЯ STEC ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОГО КОНТРОЛЮ
ЯЛОВИЧИНИ**

16.00.09 – ветеринарно-санітарна експертиза

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Сумському національному аграрному університеті Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник

доктор ветеринарних наук, професор
Касянчук Вікторія Вікторівна,
Сумський державний університет,
професор кафедри гігієни та екології з курсами
мікробіології, вірусології та імунології

Офіційні опоненти:

доктор ветеринарних наук, професор
Олійник Людмила Вікторівна,
Головне управління ветеринарної медицини в м. Києві,
начальник

кандидат ветеринарних наук, доцент
Богатко Надія Михайлівна,
Білоцерківський національний аграрний університет,
завідувач кафедри ветеринарно-санітарної експертизи

Захист відбудеться «02» червня 2016 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.004.12 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розісланий «28» квітня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Л. В. Шевченко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Експорт національної продовольчої продукції для України є важливим сегментом економіки, який сьогодні потребує великої підтримки держави та наукового супроводу, особливо в галузі безпечності харчових продуктів. Серед усіх видів національних продовольчих товарів м'ясо та м'ясопродукти (особливо яловичина та продукти з неї) мають велику перспективу успішного просування на міжнародні ринки. Для України актуальним питанням для усунення торгових бар'єрів та вільної торгівлі з країнами ЄС є гарантування відповідності вітчизняної продовольчої продукції, у тому числі м'яса яловичого, сучасним міжнародним вимогам щодо безпечності для споживачів. Щоб вирішити цю проблему, потрібно на науковій основі визначати актуальні нині ризики, навчати виробників розробляти програми моніторингу за цими ризиками та здійснювати гармонізацію національних нормативно-правових вимог у галузі безпечності харчових продуктів (Bell C., et al., 2005; Bosilevac J.M. et al., 2005; Milios K. et al., 2012; Wheatley P., 2014). Гарантія безпечності яловичини передбачає вдосконалення практик щодо гігієни харчових продуктів, упровадження сучасних критеріїв безпечності, у тому числі мікробіологічних, а також розроблення й упровадження сучасних методів ветеринарно-санітарного контролю (Бергілевич О. М., 2014; Загребельний В. О. та ін. 2010, 2012; Касянчук В. В. та ін. 2012, 2014).

Основними причинами невідповідності яловичини сучасним офіційним вимогам безпечності є недотримання мікробіологічних критеріїв, що свідчить про порушення ветеринарно-санітарних вимог під час виготовлення цієї продукції. Отже, у виробництві яловичини, яка відповідає міжнародним вимогам щодо гарантування безпечності для споживачів, важлива роль належить системі ветеринарно-санітарного контролю (Олійник Л. В., 2004; Кравчук В. В. та ін. 2009; Богатко Н. М., 2011; Якубчак О. М., 2012; Касянчук В. В., 2014).

Одним із актуальних мікробіологічних ризиків для споживачів яловичини є група високопатогенних серотипів *E. coli*: O157:H7, O26, O103, O111, O145 та інших, які продукують дуже небезпечний для людини шигатоксин і мають міжнародну назву Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Серед зазначених STEC найбільш патогенною є *E. coli* O157:H7. STEC є коменсалами в кишечнику великої рогатої худоби, тому ці тварини виступають їх резервуаром, а м'ясо та м'ясопродукти, що містять яловичину, є потенційно небезпечними щодо зазначених патогенів. При потрапленні в організм людини з їжею STEC можуть спричинити такі тяжкі захворювання, як геморагічний коліт, гемолітичний уремічний синдром і тромботична тромбоцитопенічна пурпура (Зоценко Л. В., 2001; Arthur T. M. et al., 2002, 2004; Perelle S. et al., 2004, 2005; Johnson K. E. et al., 2006; Bosilevac J. M. et al., 2011; Adams M. R. et al., 2014).

Виробники яловичини на експорт у країни ЄС повинні обов'язково контролювати ризик, пов'язаний із *E. coli* O157:H7, а також зі STEC. На цей час в Україні не акцентовано увагу виробників яловичини на необхідності розроблення програми моніторингу за вказаними патогенами, що може ускладнювати міжнародну торгівлю цією продукцією. Такі програми моніторингу мають

базуватися на науковій оцінці ризику та включати вдосконалений ветеринарно-санітарний контроль. Це в свою чергу сприятиме виробництву яловичини, яка за мікробіологічною безпечністю відповідатиме вимогам ЄС.

Встановлення впливу рівня санітарії та гігієни при виробництві яловичини на її відповідність чинним мікробіологічним критеріям, у т. ч. *Enterobacteriaceae*, а також на контамінацію іншими індикаторними й патогенними мікроорганізмами, надзвичайно важливе для забезпечення конкурентоспроможності цієї продукції як на міжнародному, так і на вітчизняному ринку. Зазначене вище зумовило вибір напряму проведення наукових досліджень з метою поліпшення ветеринарно-санітарного і виробничого контролю виробництва яловичини. Наукове обґрунтування ветеринарно-санітарних заходів і критеріїв мікробіологічної безпечності яловичини, щоб вона відповідала сучасним міжнародним вимогам, має для України важливе соціальне й економічне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є складовою частиною наукових тем, які виконуються на кафедрі технології молока і м'яса Сумського національного аграрного університету: «Вдосконалення методологічного та методичного забезпечення щодо якості та безпечності сировини тваринного походження (молоко і м'ясо) та продуктів з неї згідно з сучасними вимогами ЄС» (номер державної реєстрації № 0114U002207, 2014–2018 рр.); «Наукове обґрунтування вдосконалення нормативно-методичного супроводу якості і безпечності продуктів тваринного походження до сучасних європейських вимог» (номер державної реєстрації № 0114U 002208, 2014–2018 рр.). Дисертаційна робота також є складовою частиною досліджень, передбачених тематичними планами Інституту ветеринарної медицини НААН (договір № 13 від 23.04.13 р. з ІВМ НААН, м. Київ).

Мета і задачі дослідження. Мета дисертаційної роботи – науково-експериментальне обґрунтування методу визначення STEC у яловичині та санітарно-гігієнічних умов виробництва на основі встановлення індикаторних мікроорганізмів у змивах з туш та з об'єктів, з якими вони контактують при первинній обробці, для поліпшення мікробіологічної безпечності яловичини та вдосконалення ветеринарно-санітарного контролю.

Для реалізації зазначеної мети було визначено такі задачі:

- проаналізувати причини невідповідності показників безпечності яловичини, призначеної для експорту, за офіційними даними державної статистики;
- експериментально встановити відповідність яловичини національним мікробіологічним критеріям гігієни виробничого процесу (КМАФАНМ, бактерії родини *Enterobacteriaceae*) за умов гігієни та санітарії на підприємствах;
- дослідити рівні контамінації поверхонь яловичих туш коліформними мікроорганізмами та *E. coli* за умов виробничої гігієни та санітарії;
- розробити науково обґрунтований ПЛР-метод контролю мікробіологічної безпечності яловичини щодо STEC;
- дослідити ПЛР-методом рівень контамінації STEC яловичих туш залежно від рівня виробничої санітарії та гігієни;

– науково обґрунтувати використання кількісних значень загальних коліформних мікроорганізмів та *E. coli* як мікробіологічних критеріїв для контролю за STEC та умовами санітарії і гігієни при виробництві яловичини;

– удосконалити ветеринарно-санітарний контроль яловичини для гарантування її мікробіологічної безпечності щодо STEC, використовуючи комплекс критеріїв гігієни у стандартних санітарних програмах (ССОП) під час первинної переробки яловичини.

Об'єкт дослідження – ветеринарно-санітарний контроль виробничої гігієни та безпечність яловичини щодо STEC, санітарно-гігієнічні показники.

Предмет дослідження – вплив санітарії та гігієни, взаємозв'язок мікроорганізмів – маркерів гігієни та патогенних *E. coli*, маркери патогенності *E. coli*, молекулярні методи діагностики.

Методи дослідження – органолептичні, ветеринарно-санітарні, мікробіологічні (КМАФАнМ, бактерії родини *Enterobacteriaceae*, загальні коліформи, *E. coli*, STEC), молекулярні, статистичні, аналітичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше в Україні вдосконалено ветеринарно-санітарний та виробничий контроль мікробіологічної безпечності яловичини щодо STEC, що включає використання критеріїв виробничої гігієни (загальні коліформи, *E. coli*), а також ідентифікацію ДНК STEC методом полімеразної ланцюгової реакції розробленою тест-системою «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест».

Встановлено, що, за офіційними даними, основні показники мікробіологічної небезпечності яловичини – перевищення КМАФАнМ і наявність БГКП, які є актуальними для ветеринарно-санітарного контролю. Вперше обґрунтовано використання кількісних значень загальних коліформ та *E. coli* як індикаторів обсіменіння яловичини STEC та як цільових санітарно-показових мікроорганізмів дотримання ветеринарно-санітарних виробничих вимог при первинній обробці туш. Експериментально доведено безпосередній взаємозв'язок між кількісними значеннями коліформ і *E. coli* на поверхні яловичих туш та рівнем обсіменіння їх STEC.

Обґрунтовано оптимальні мікробіологічні критерії гігієни процесу виробництва яловичини та її мікробіологічної безпечності щодо STEC при застосуванні межових значень кількості коліформ і *E. coli* у змивах з поверхні туш для використання у стандартних санітарних програмах (ССОП) та здійснення державного ветеринарно-санітарного нагляду і контролю за діяльністю суб'єктів господарювання при виготовленні яловичого м'яса.

Уперше розроблено тест-систему «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест» для виявлення та ідентифікації ДНК STEC.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано комплекс заходів для гарантування мікробіологічної безпечності яловичини щодо STEC, який включає два мікробіологічні критерії гігієни та санітарії: кількісні значення загальних коліформ та *E. coli* і метод ПЛР. Доведено можливість використання кількісних значень загальних коліформ та *E. coli* для виробничого та ветеринарно-

санітарного контролю у ССОП, що сприяє підвищенню рівня безпеки яловичини.

Для ефективного ветеринарно-санітарного контролю за мікробіологічною безпекою яловичини запропоновано тест-систему «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест» для виявлення та ідентифікації ДНК STEC. За результатами наукових досліджень розроблено «Методичні рекомендації щодо застосування систем простежуваності для контролю безпеки харчових продуктів у харчовому ланцюгу», (затверджено вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи й рекомендовано до впровадження у практику ветеринарно-санітарного контролю безпеки продукції тваринного походження, протокол № 5 від 30 жовтня 2014 р.).

Використання запропонованого комплексу заходів поліпшує ветеринарно-санітарний і виробничий контроль за STEC та санітарією і гігієною на підприємствах під час первинної обробки яловичих туш, що відповідає сучасним вимогам до яловичини для міжнародної торгівлі.

Особистий внесок здобувача. Здобувач на основі власного практичного досвіду визначила актуальний напрям наукових досліджень, науково обґрунтований спільно з науковим керівником. Було встановлено мету і задачі, розроблено програму проведення досліджень та ефективні шляхи її реалізації. Здобувач самостійно опрацювала літературні джерела вітчизняних і зарубіжних авторів, провела науково-практичні, лабораторні дослідження, проаналізувала їх, статистично обробила отримані результати, оформила список використаних джерел і рукопис дисертації. Наукову інтерпретацію та узагальнення отриманих результатів у висновках та пропозиціях, підготовку й написання дисертації та автореферату здобувач здійснила самостійно за консультування наукового керівника доктора ветеринарних наук, професора В. В. Касянчук.

Спільно з колективом авторів із Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів та Сумського національного аграрного університету розроблено метод визначення патогенних *E. coli* за допомогою ПЛР «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест».

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації доповідалися на науково-практичних конференціях Сумського національного аграрного університету (м. Суми, 2014-2015рр.); засіданнях вченої ради Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок (м. Львів, 2014р.); робочих нарадах у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів щодо розроблення тест-системи «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест» (м. Київ, 2015р.); міжкафедральному засіданні факультету ветеринарної медицини Сумського національного аграрного університету (м. Суми, 2015р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 11 наукових праць, із них 4 статті у наукових фахових виданнях України, 3 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародної наукометричної бази даних, стаття у науковому виданні України, включеному до міжнародної наукометричної бази даних, методичні рекомендації, матеріали та тези наукових доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 8 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстровано 24 таблицями і 25 рисунками. Список використаних джерел включає 217 найменувань, з яких 139 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи досліджень. Дисертаційна робота виконувалась упродовж 2012–2015 рр. у науково-дослідній лабораторії хімічних та мікробіологічних досліджень молока та м'яса факультету харчових технологій Сумського національного аграрного університету, в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи та у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів, на м'ясопереробних підприємствах Київської та Одеської областей. Для досягнення поставленої мети наукові дослідження проводили за такими етапами:

1 – виявлення цільових мікробіологічних небезпек у яловичині, визнаній невідповідною для міжнародної торгівлі, за якими слід удосконалити ветеринарно-санітарний та виробничий контроль (на основі ретроаналізу даних офіційних лабораторних досліджень);

2 – визначення рівня відповідності яловичини чинним мікробіологічним критеріям гігієни (КМАФАнМ та *Enterobacteriaceae*) за різних умов санітарії та гігієни під час їх первинної переробки на підприємствах;

3 – встановлення рівня контамінації поверхні яловичини коліформними бактеріями та *E. coli* за різних умов санітарії та гігієни під час їх первинної обробки на підприємствах;

4 – розроблення тест-системи для виявлення ДНК шигатоксинпродукуючих *E. coli* мультиплексним варіантом методу ПЛР;

5 – визначення рівня поширення STEC серед виділених нами ізолятів *E. coli* з поверхні яловичих туш та шкур;

6 – удосконалення ветеринарно-санітарного контролю за показниками мікробіологічної безпечності яловичини щодо STEC за використання комплексу критеріїв для моніторингу рівня виробничої санітарії та гігієни під час первинної переробки туш.

Матеріалом для аналітичних досліджень стали результати офіційних лабораторних досліджень продукції тваринного походження, призначеної для міжнародної торгівлі, в якій було виявлено невідповідність чинним вимогам безпечності (дані акредитованих державних лабораторій ветеринарної медицини за 2012–2013 рр.). Використовували ветеринарно-санітарні, органолептичні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, аналітичні, статистичні методи досліджень згідно із загальноприйнятими методиками та чинними в Україні нормативно-правовими актами. Мікробіологічні дослідження проводили згідно з чинними стандартами у Державному науково-дослідному інституті з лабораторної

діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи та в Сумському національному аграрному університеті. Метод ПЛР для молекулярно-генетичної ідентифікації STEC розробляли у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Дослідження проводили на 8 підприємствах, які планують постачати яловичину на експорт. Для проведення експериментів зазначені підприємства було підібрано й умовно поділено на дві групи: підприємства групи А (контроль) – з належним рівнем санітарних умов (візуально не виявлено бруду на контактних до туш поверхнях та в у виробничому цеху, мікробіологічними дослідженнями змивів з туш та контактних поверхонь не було встановлено відхилень від ветеринарно-санітарних норм); та підприємства групи Б – дослід, з незначними порушеннями санітарно-гігієнічних умов на підприємстві.

Проби з туш яловичих відбирали після забою, використовуючи неруйнівний метод – узяття змивів. Змиви відбирали відповідно до правил асептики з площі 100 см² з таких місць кожної півтуші, як шия, лопатка, ділянки груднини, черевної стінки (зовнішня та внутрішня поверхні) і стегон. Змиви відбирали з поверхні шкур і туш на таких технологічних процесах: до зняття шкіри, після знекровлення (поверхня шкур); після зняття шкіри, до нутрування; після нутрування; після заключного туалету туш. Заключний туалет туш здійснювався шляхом обмивання їх водою. Показники МАФАНМ та кількості бактерій родини *Enterobacteriaceae*, коліформ та *E. coli* визначали шляхом посіву 10-кратних розведень (10⁻¹ до 10⁻⁵) змивів на відповідний селективний агар в одноразові чашки Петрі «Compact Dry» (виробник NISSUI Pharma) у двократному повторі. Підраховані колонії досліджуваних мікроорганізмів з арифметичних значень переводили у десяткові логарифми. Виділяли й підраховували STEC у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Для розроблення тест-системи «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест» розраховали олігонуклеотидні праймери (мультиплексний варіант ПЛР) за допомогою програмного забезпечення «Vector NTI» v.10.0.1 (Invitrogen) і синтезували їх у НВФ «ЛИТЕХ» (Росія). Ліофілізовані праймери розводили до концентрації 100 пкм/мкл «Ultra Pure Distilled Water» (Invitrogen, Cat.#10977-023, США) і зберігали за температури – 20 °С до використання. Концентрацію і чистоту отриманих препаратів ДНК вимірювали на спектрофотометрі «NanoDrop 2000с» (США). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на термоциклерах «Терцик» (ДНК-технологія, Росія) та «Т1» (Biometra, Німеччина). Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР здійснювали шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5 % гелі агарози (Sigma, США). Розташування смуг ДНК на отриманій електрофореграмі та їх реєстрацію виконували за допомогою системи гель-документування «Molecular Image GelDoc XR+» (BioRad, США). Для контролю за станом санітарно-гігієнічних показників при первинній обробці туш та за STEC у яловичині розробляли межові значення індикаторних мікроорганізмів.

Отримані результати експериментальних досліджень групували й обробляли статистично з визначенням середнього арифметичного (М), помилки середнього арифметичного (m). Відмінність вважалася достовірною при досягнутому рівні

значущості (P) нижче 0,05. Рівні статистичної значущості оцінювали відповідно до таких значень «P»: $P \leq 0,05$ – статистично значущий рівень; $P \leq 0,001$ – статистично високозначущий рівень; $P > 0,05$ – немає статистичної значущості.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Аналіз причин невідповідності яловичини для міжнародної торгівлі за показниками безпечності. Статистичним аналізом офіційних лабораторних даних встановлено, що в 2012–2013 рр. серед експортної української продовольчої продукції тваринного походження, в якій було виявлено невідповідність чинним вимогам безпечності, м'ясопродукти становили в середньому 25,9 %, зокрема м'ясо яловиче – 19,5 %. Натомість серед імпортованої м'ясопродукції частка невідповідної яловичини становила 12,8 %. До невідповідної яловичини було віднесено такі її види: заморожена обвалена яловичина, язик яловичий, яловичина у четвертинах, яловичина заморожена. Встановлено, що основними причинами невідповідності м'ясопродуктів, призначених для експорту (імпорту), було недотримання мікробіологічних критеріїв, а саме: перевищення значень кількості мезофільних аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів (КМАФАНМ) та виявлення бактерій групи кишкових паличок (БГКП). За аналізований період частка невідповідних імпортованих м'ясопродуктів за показником КМАФАНМ становила в середньому 29,3 %, а за БГКП – 24,5 %. Аналогічні показники щодо м'ясопродукції на експорт становили відповідно 38,05 і 19,2 %.

Невідповідність критеріям КМАФАНМ і БГКП свідчить про порушення правил санітарії та гігієни під час виробництва яловичини. Було встановлено, що на національному рівні яловичина не досліджується на відповідність такому міжнародному критерію гігієни виробничого процесу, як бактерії родини *Enterobacteriaceae*. Цей критерій акцентує увагу на обсіменінні продукції бактеріями, які належать до мікрофлори кишечника. Серед них можуть бути й патогенні види.

Визначення рівня відповідності яловичини мікробіологічним критеріям гігієни (КМАФАНМ та *Enterobacteriaceae*) за впливу виробничої санітарії та гігієни. Встановлюючи вплив санітарного стану умов виробництва яловичини на відповідність її чинним мікробіологічним критеріям гігієни виробничого процесу (МАФАНМ та *Enterobacteriaceae*), досліджували поверхні обладнання, інструментів – ножі, гаки, руки персоналу, а також повітря та воду, які мають важливе значення при первинній обробці туш.

Встановлено, що серед усіх досліджуваних об'єктів м'ясопереробних підприємств найбільш контаміновані мікроорганізмами були поверхні гаків і ножів. Усі досліджувані об'єкти мали вищі значення КМАФАНМ та *Enterobacteriaceae* у теплу пору року, ніж у весняно-зимовий період. Частка бактерій родини *Enterobacteriaceae* щодо показника КМАФАНМ у КУО/см² у середньому становила: на гаках для підвішування туш у холодну пору року – 32–44 %, у теплу пору – 53–67 %; на поверхні ножів – відповідно 32–35 і 51–54 %; у змивах з поверхні рук персоналу – відповідно 26–28 і 28–31 %.

Мікробне обсіменіння поверхонь, які контактують з яловичиною ($M \pm n$; $n=18$)

Об'єкт дослідження	Весна – зима		Літо – осінь	
	Група підприємств		Група підприємств	
	А	Б	А	Б
	КУО $\times 10^6$ см ²	КУО $\times 10^6$ см ²	КУО $\times 10^6$ см ²	КУО $\times 10^6$ см ²
КМАФАНМ				
Гаки	51,8 \pm 1,2	85,9 \pm 1,6*	73,1 \pm 2,3	91,8 \pm 3,5*
Ножі	37,3 \pm 1,6	69,4 \pm 2,3*	52,2 \pm 3,1	76,4 \pm 2,5*
Руки персоналу	3,1 \pm 0,02	5,1 \pm 0,9*	6,9 \pm 0,1	12,2 \pm 0,1*
Повітря в зоні забою	25,5 \pm 0,6	37,5 \pm 1,1*	34,3 \pm 1,3	48,9 \pm 1,4
Вода водопровідна, питна	2,08 \pm 0,01	2,09 \pm 0,01	2,13 \pm 0,03	2,13 \pm 0,04
Вода технічна	3,05 \pm 0,2	3,07 \pm 0,1	3,21 \pm 0,2	3,36 \pm 0,1
Бактерії родини <i>Enterobacteriaceae</i>				
Гаки	16,4 \pm 2,3	37,6 \pm 3,1*	39,1 \pm 1,7	61,4 \pm 3,2*
Ножі	12,3 \pm 1,6	24,7 \pm 2,3*	26,7 \pm 2,7	57,4 \pm 2,4*
Руки персоналу	0,8 \pm 0,05	1,4 \pm 0,08*	1,9 \pm 0,2	3,9 \pm 0,8
Повітря в зоні забою	7,5 \pm 0,9	12,3 \pm 1,02	13,5 \pm 1,6	20,3 \pm 1,9
Вода водопровідна, питна	1,76 \pm 0,1	1,77 \pm 0,1	1,89 \pm 0,2	1,95 \pm 0,1
Вода технічна	2,89 \pm 0,1	2,93 \pm 0,1	2,99 \pm 0,2	3,16 \pm 0,1

Примітка. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

Дані табл. 1 свідчать також про те, що показник КМАФАНМ у воді питній у теплу пору року був на 10–12 % вищим, ніж у зимово-весняний період. Кількість бактерій родини *Enterobacteriaceae* була відповідно вищою на 34–45 %. Результати досліджень контамінації поверхонь яловичих туш КМАФАНМ і бактеріями родини *Enterobacteriaceae* наведено в таблицях 2 та 3. Дані свідчать, що на поверхнях яловичих туш після зняття шкури та нутрування значення критеріїв КМАФАНМ та *Enterobacteriaceae* були вищими, ніж після заключного туалету туш. Встановлено, що зазначені показники перевищували допустимі норми на таких ділянках туш, як внутрішні поверхні грудної та черевної порожнини.

На підприємствах групи Б майже на всіх досліджуваних ділянках поверхні яловичих туш рівень контамінації КМАФАНМ та *Enterobacteriaceae* перевищував чинні мікробіологічні критерії. З кожною наступною технологічною операцією, починаючи від процесу зняття шкур і аж до заключного туалету яловичих туш, кількість КМАФАНМ та *Enterobacteriaceae* на їхніх поверхнях зростала (табл. 3). Частка бактерій родини *Enterobacteriaceae* у складі показника КМАФАНМ на досліджуваних поверхнях яловичих туш становила в середньому 40–50 % (табл. 2, 3).

Контамінація поверхні туш яловичих МАФАНМ та бактеріями родини *Enterobacteriaceae* (підприємства групи А) (M±n; n=18)

Відбір проб з туш після	Місце відбору проб						
	шия	лопатка	грудна стінка, з. п.	грудна стінка, в. п.	черевна стінка, з. п.	черевна стінка, в. п.	стегно
МАФАНМ, Log КУО/см²							
Зняття шкури	4,88±0,3*	4,76±0,2*	4,87±0,7	–	4,89±0,4*	–	4,79±0,3*
Нутрування	4,89±0,2	4,86±0,7	4,87±0,5	5,01±0,6	4,83±0,7	5,09±0,5	4,93±0,6
Заключного туалету	4,84±0,3*	4,81±0,2*	4,80±0,3	5,04±0,4	4,87±0,4*	5,09±0,3	4,87±0,2*
Бактерії родини <i>Enterobacteriaceae</i>, Log КУО/см²							
Зняття шкури	2,28±0,4*	2,13±0,7*	2,19±0,2	–	2,29±0,3*	–	2,23±0,2
Нутрування	2,29±1,2	2,25±0,4	2,26±0,3	2,46±0,5	2,33±0,5	2,65±0,6	2,32±0,3
Заключного туалету	2,25±0,9*	2,23±0,3*	2,25±0,1	2,45±0,3	2,29±0,5*	2,52±0,2*	2,29±0,4

Примітки: з. п. – зовнішня поверхня; в. п. – внутрішня поверхня; *P<0,001 порівняння значення: після зняття шкури та після заключного туалету. (Чинні офіційні критерії, з якими порівнювали результати: МАФАНМ 3,5–5,0 Log КУО/см², *Enterobacteriaceae* 1,5–2,5 Log КУО/см²).

Дослідження підтвердили пряму залежність мікробіологічних показників поверхні яловичих туш від санітарно-гігієнічних умов їх первинної переробки. Дані таблиці 3 свідчать, що у разі порушення санітарно-гігієнічних умов виробництва рівень мікробної контамінації яловичих туш не відповідав чинним мікробіологічним критеріям гігієни. Невідповідність яловичини таким критеріям гігієни, як МАФАНМ і *Enterobacteriaceae*, становить загрозу контамінації її патогенними мікроорганізмами, які можуть спричиняти тяжкі захворювання в людини.

Визначення рівня контамінації яловичини коліформними бактеріями та *E. coli* за впливу умов виробничої санітарії. Встановлено, що рівень контамінації загальними коліформами та *E. coli* об'єктів, що контактують з тушами під час їх первинної обробки, був вищим на підприємствах групи Б порівняно з показниками, отриманими на підприємствах групи А. Результати досліджень із встановлення рівня контамінації яловичини за різних санітарних умов їх первинної обробки

наведено в таблицях 4 та 5. Із досліджуваних контактних поверхонь найбільш контамінованими були гаки. Рівень їх обсіменіння загальними коліформами на підприємствах групи А визначався в межах $4,44 \pm 0,6 \text{ Log /КУО см}^2$, а на підприємствах групи Б – $5,08 \pm 0,6 \text{ Log /КУО см}^2$.

Таблиця 3

Контамінація поверхні туш яловичих МАФАНМ та бактеріями родини *Enterobacteriaceae* (підприємства групи Б) ($M \pm n$; $n=18$)

Відбір проб з туш після	Місце відбору проб						
	шия	лопатка	грудна стінка, з. п.	грудна стінка, в. п.	черевна стінка, з. п.	черевна стінка, в. п.	стегно
МАФАНМ, Log КУО/см²							
Зняття шкіри	4,94±0,7*	4,88±0,1*	5,06±0,2	–	5,17±0,8*	–	5,09±0,4*
Нутривання	5,18±0,8	5,09±0,6	5,09±0,7	5,13±0,7	5,27±0,6	5,29±0,3	5,11±0,5
Заклучного туалету	5,07±0,6	5,01±0,5	5,05±0,5	5,09±0,4	5,11±0,8*	5,12±0,6	5,04±0,6
Бактерії родини <i>Enterobacteriaceae</i>, Log КУО/см²							
Зняття шкіри	2,64±0,7*	2,61±0,4*	2,66±0,7	–	2,70±0,8*	–	2,63±0,4*
Нутривання	2,71±1,2	2,68±0,6	2,69±0,7	2,72±0,7	2,76±0,8	2,82±0,6	2,71±0,5
Заклучного туалету	2,65±1,2*	2,59±0,6*	2,59±0,7	2,68±0,7	2,68±0,8*	2,70±0,6	2,62±0,5*

Примітки. з. п. – зовнішня поверхня; в. п. – внутрішня поверхня; * $P < 0,001$ порівняння значення: після зняття шкіри та після заклучного туалету.

Визначення рівня контамінації яловичини коліформними бактеріями та *E. coli* за впливу умов виробничої санітарії. Встановлено, що рівень контамінації загальними коліформами та *E. coli* об'єктів, що контактують з тушами під час їх первинної обробки, був вищим на підприємствах групи Б порівняно з показниками, отриманими на підприємствах групи А. Результати досліджень із встановлення рівня контамінації яловичини за різних санітарних умов їх первинної обробки наведено в таблицях 4 та 5. Із досліджуваних контактних поверхонь найбільш контамінованими були гаки. Рівень їх обсіменіння загальними коліформами на підприємствах групи А визначався в межах $4,44 \pm 0,6 \text{ Log /КУО см}^2$, а на підприємствах групи Б – $5,08 \pm 0,6 \text{ Log /КУО см}^2$.

**Контамінація поверхні яловичини коліформними бактеріями
та загальними *E. coli* (підприємства групи А) (M±n; n=18)**

Відбір проб з туш після	Місце відбору проб						
	шия	лопатка	грудна стінка, з. п.	грудна стінка, в.п.	черевна стінка, з.п.	черевна стінка, в.п.	стегно
Коліформні бактерії, Log КУО/см²							
Зняття шкіри	1,46±0,2*	1,41±0,4*	1,33±0,1	–	1,54±0,3*	–	1,59±0,3*
Нутрування	1,61±0,3	1,58±0,3	1,62±0,3	1,6±0,2	1,72±0,1	1,83±0,3	1,84±0,1
Заключного туалету	1,60±0,2*	1,57±0,3*	1,61±0,1	1,66±0,2	1,71±0,2*	1,80±0,2	1,82±0,3*
Загальні <i>E. coli</i>, Log КУО/см²							
Зняття шкіри	0,95±0,2*	0,80±0,3*	0,98±0,5	–	0,96±0,2*	–	1,01±0,3*
Нутрування	1,11±0,3	1,05±0,1	0,96±0,3	1,08±0,3	1,47±0,5	1,52±0,4	1,28±0,2
Заключного туалету	1,07±0,1*	1,04±0,1*	0,95±0,3	1,02±0,3	1,46±0,3	1,51±0,4	1,27±0,2*

Примітка. *P≤0,05 (порівняння показників після зняття шкіри до показників після заключного туалету)

Кількість *E. coli* на поверхні гаків становила: на підприємствах групи А – 4,09±0,5; групи Б – 4,29±0,4. У теплу пору року кількість зазначених мікроорганізмів на поверхні гаків збільшувалась у середньому на 6–10 %. На поверхнях рук персоналу кількість коліформних мікроорганізмів була в середньому в межах від 3,54±0,2 до 3,96±0,2 Log /КУО см², а кількість *E. coli* – від 3,18±0,2 до 3,77±0,4 Log /КУО см².

Отже, за даними таблиць 4 і 5, на підприємствах груп А і Б найбільш контамінованими були поверхні туш у ділянках шиї та стегна до нутрування, а після нього більшу кількість мікроорганізмів виявляли на внутрішніх поверхнях грудної та черевної порожнин. Кількість коліформних бактерій на досліджуваних поверхнях туш в обох групах підприємств була більшою, ніж *E. coli*. Кількість *E. coli* зростала після нутрування в середньому в 1,3 раза порівняно з кількістю цих мікроорганізмів після зняття шкіри з туш.

Дані, наведені в табл. 4 та 5, було використано для встановлення середніх значень результатів досліджень змивів з усіх досліджуваних ділянок поверхні яловичих туш щодо рівня обсіменіння їх загальними коліформами та *E. coli* на підприємствах обох груп. Середні значення кількості коліформних бактерій на поверхнях туш становили: на підприємствах групи А – 1,62 Log КУО/см², групи

Б – 2,32 Log КУО/см². Середні значення кількості *E. coli* на підприємствах групи А дорівнювали 1,15 Log КУО/см², групи Б – 1,78 Log КУО/см². Ці дані стали основою для визначення рівнів контамінації поверхні яловичих туш, які свідчать про їх належну санітарну якість та мікробіологічну безпечність.

Таблиця 5

Контамінація поверхні туш яловичих коліформними бактеріями та загальними *E. coli* (підприємства групи Б) (M±n; n=22)

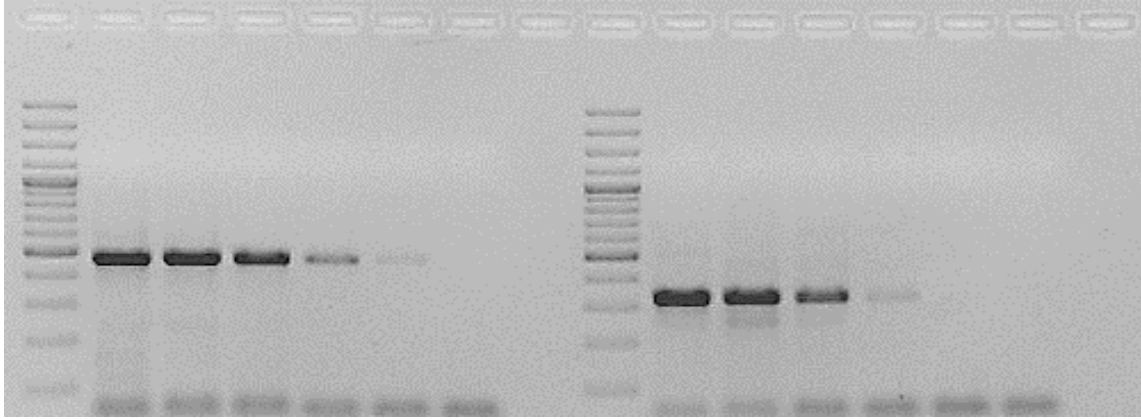
Відбір проб з туш після	Місце відбору проб						
	шия	лопатка	грудна стінка, з. п.	грудна стінка, в. п.	черевна стінка, з. п.	черевна стінка, в. п.	стегно
Коліформні бактерії, Log КУО/см²							
Зняття шкіри	2,21±0,3*	2,13±0,2	2,09±0,3	–	2,15±0,2*	–	2,20±0,4*
Нутривання	2,46±0,1	2,44±0,2	2,33±0,2	2,40±0,3	2,39±0,2	2,45±0,3	2,41±0,3
Заключного туалету	2,40±0,2*	2,42±0,3	2,30±0,3	2,39±0,4	2,38±0,2*	2,46±0,4	2,37±0,3*
Загальні <i>E. coli</i>, Log КУО/см²							
Зняття шкіри	1,51±0,2*	1,38±0,1*	1,49±0,3	–	1,62±0,3*	–	1,68±0,3*
Нутривання	1,89±0,3	1,69±0,1	1,73±0,3	1,77±0,3	2,02±0,5	2,11±0,3	1,89±0,1*
Заключного туалету	1,83±0,3*	1,64±0,2*	1,69±0,3*	1,71±0,5	1,98±0,2	2,06±0,3	1,82±0,1*

Примітка. * P≤0,05 (порівняння показників після зняття шкіри до показників після заключного туалету)

Розроблення молекулярно-біологічного методу виявлення та ідентифікації STEC на яловичих тушах. Для виявлення та ідентифікації STEC було розроблено олігонуклеотидні праймери, специфічні до генів токсину *stx1* і *stx2* та всіх поліморфних варіантів гена *eae* (інтиміну), які ми перевірили на чутливість і специфічність електрофоретичним аналізом в 1,5 % гелі агарози за використання штамів *E. coli* таких серотипів: O19, O20, O25, O26, O45, O55, O103, O111, O145 та двох штамів серотипу O157. Концентрацію очищеної ДНК у зразках було визначено спектрофотометрично вона становила для штаму O145 – 22,28 нг/0,001 см³ (ген *eae*). Концентрація очищеної ДНК у зразках для штаму O157 (ген *stx2*) дорівнювала 20,70 нг/0,001 см³.

Для перевірки специфічності й чутливості синтезованих праймерів як можливе джерело цільових генів було використано штами *E. coli* різних серотипів з колекцій відділу біотехнології та контролю якості бактеріальних препаратів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

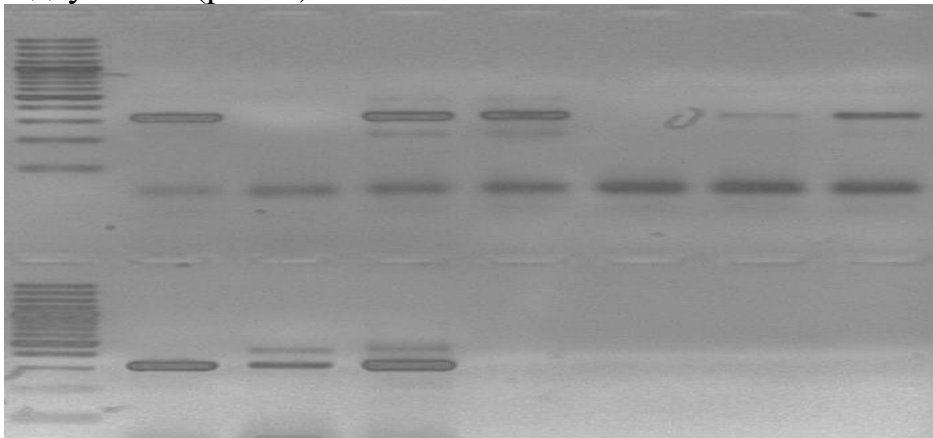
та Національного центру штамів мікроорганізмів. Специфічність праймерів підтвердили на тестових штамів гетерологічних мікроорганізмів: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida* та *Yersinia enterocolitica*. У результаті проведених досліджень ген *stx2* було виявлено в одного штаму *E. coli* серотипу O157, а ген *eae* – у штаму *E. coli* серотипу O145 та одного з двох штамів серотипу O157. Як негативний контроль було використано штам *E. coli* серотипу O19 (рис. 1).



М 1 2 3 4 5 6 7 М 8 9 10 11 12 13 14

Рис. 1. Визначення чутливості праймерів до генів *stx2* та *eae* з препаратами очищеної ДНК бактерій *E. coli*: М – маркер «100 bp Plus DNA Ladder» (Fermentas). Штам O157: 1 – 207 нг ДНК; 2 – 20,7 нг ДНК; 3 – 2,1 нг ДНК; 4 – 0,21 нг ДНК; 5 – 0,021 нг ДНК; 7 – негативний контрольний зразок. Штам O145: 8 – 222,8 нг ДНК; 9 – 22,28 нг ДНК; 10 – 2,23 нг ДНК; 11 – 0,22 нг ДНК; 12 – 0,02 нг ДНК; 13 – 0,002 нг ДНК; 14 – негативний контрольний контроль.

Розроблені праймери було використано для виявлення й ідентифікації STEC при дослідженні 120 ізольованих колоній *E. coli* зі змивів з поверхні яловичих туш і шкур (40 ізолятів – з поверхні шкур та 80 – з поверхні туш). Ізоляти *E. coli* вважали позитивними щодо STEC за наявності генів *stx1*, *stx2* та *eae*, а негативними – за їх відсутності (рис. 2).



М К(+) 1 8

Рис. 2. Результати електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР з ізолятами *E. coli*, виділених з поверхонь туш яловичих: М – маркер «100 bp Plus DNA Ladder» (Fermentas), К(+) – позитивний контрольний зразок (штам O145, ген *eae*), 1–8 – ізоляти *E. coli*

Було підтверджено на належність до STEC 8 ізолятів *E. coli*, що становить 6,7 %. При цьому 2 позитивні ізоляти *E. coli* були з об'єктів підприємств групи А, а 6 ізолятів – із підприємств групи Б. Із 8 STEC підтверджених ізолятів у 5 було встановлено наявність *stx2* та гена інтиміну (*eae*), а у 3 ізолятів виявлено тільки ген *stx2*. За результатами вищенаведених досліджень було розроблено тест-систему «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест». Комісійні випробування даної тест-системи показали її високу чутливість і специфічність.

Розроблення заходів ветеринарно-санітарного контролю за рівнем гігієни та за STEC під час виробництва яловичини. Наші дослідження, а також дані наукової літератури демонструють важливість використання коліформних мікроорганізмів та *E. coli* як критеріїв рівня санітарії та гігієни виробничого процесу та в системі заходів попередження контамінації туш STEC. Особливістю виробництва безпечної яловичини на експорт є те, що сировина повинна відповідати не тільки чинним офіційним мікробіологічним критеріям, а ще й бути безпечною щодо STEC. Це повинно бути підтверджено виробником та у офіційних ветеринарних документах про безпечність яловичини. Для України особливо актуально, що виробники яловичини на експорт налагодили належний контроль за санітарно-гігієнічними умовами виробництва яловичини для профілактикування STEC, щоб вона відповідала усім сучасним вимогам щодо її безпечності.

Результати досліджень, що наведені в попередніх розділах нашої дисертаційної роботи вказують на можливість використання результатів моніторингу індикаторних мікроорганізмів для контролю рівня санітарно-гігієнічного стану виробництва яловичих туш та для визначення мікробіологічної безпечності їх відносно шига-токсинуотворювальних *E. coli*.

Як свідчать дані літератури та наші дослідження, STEC виявляються в невеликих кількостях та не на всій поверхні туші, а лише на окремих її ділянках. Тому негативний результат на STEC не може означати відсутності цих мікроорганізмів на поверхні туші. У зв'язку з цим дослідження спрямовано на контроль за STEC повинні проводитись систематично щоб отримати більш достовірну інформацію. Це можливо лише за умови виконання виробником розроблених науково обґрунтованих заходів.

Згідно з нашими дослідженнями за належних умов виробництва яловичини узагальнена кількість *E. coli* на поверхні туш становила в середньому до 20 КУО/см² змиву, а коліформних бактерій – до 50 КУО/см², тоді як при порушенні правил санітарії та гігієни ці показники дорівнювали 60 і 200 КУО/см² відповідно. У зв'язку з цим на основі експериментальних даних було визначено оптимальні середні значення критеріїв для коліформних мікроорганізмів та *E. coli*, які становлять відповідно 45–50 і 15–20 КУО/см². Ми склали алгоритм дій щодо розроблення й упровадження системи санітарно-гігієнічних заходів із дотримання виробничої санітарії і гігієни та запобігання контамінації яловичих туш STEC. Також було обґрунтовано порядок відбору проб для визначення кількісних значень коліформних мікроорганізмів та *E. coli* у змивах з поверхні яловичих туш, періодичність їх дослідження й оцінки тренду результатів із

встановленням тенденцій стабільності чи погіршення ситуації за оцінками «стабільно добре», «задовільно», «незадовільно» або «результати нестабільні». Результати вищезазначених досліджень при виробництві яловичих туш мають важливе значення для виробників, які, користуючись ними, зможуть надати відповідним органам підтвердження про належний контроль за STEC на підприємстві й демонструватимуть дотримання вимог санітарних заходів.

Якщо при ветеринарно-санітарному контролі підприємства з виробництва яловичини буде встановлено перевищення критеріїв щодо загальних коліформ та *E. coli*, слід рекомендувати його керівництву покращувати умови санітарії та гігієни, а також досліджувати змиви з туш методом ПЛР для ідентифікації STEC. Такий комплексний моніторинг за коліформними мікроорганізмами та *E. coli*, а також ведення відповідних записів є доказовою базою для перевірок, передбачених ветеринарно-санітарним наглядом, щодо належного самоконтролю виробника за виробничою санітарією та гігієною, а також за STEC. Використання розробленого комплексу ветеринарно-санітарних заходів має важливе значення, оскільки сприяє простежуваності в кожній ланці ланцюга «від ферми – до столу».

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі викладено теоретичне, науково-експериментальне обґрунтування й практичне вирішення нового підходу в методології встановлення мікробіологічних критеріїв щодо *Enterobacteriaceae* та STEC як індикаторних мікроорганізмів на поверхні туш – загальних коліформ і *E. coli* та за використання розробленого ПЛР-методу.

1. Ретроспективним статистичним аналізом результатів офіційних лабораторних досліджень встановлено, що протягом 2012–2013 рр. основними причинами невідповідності яловичини чинним вимогам безпечності у 33,9 % випадків були перевищення показника КМАФАНМ, а в 21,9 % випадків – виявлення БГКП, що є наслідком порушення виробничої гігієни та санітарії.

2. Встановлено, що під час первинної переробки яловичини характерним показником порушення вимог виробничої санітарії та гігієни було перевищення значень показників КМАФАНМ та *Enterobacteriaceae* на поверхнях об'єктів, які контактують з тушами, в середньому на 3,4 і 4,5 % порівняно з аналогічними показниками при дотриманні зазначених вимог. У теплу пору значення показників КМАФАНМ та *Enterobacteriaceae* були вищими, ніж у холодну, в середньому на 0,1–0,2 %. Визначено, що на досліджуваних об'єктах бактерії родини *Enterobacteriaceae* у складі показника КМАФАНМ становили 40–50 %, що свідчить про важливе значення останніх як індикаторів санітарно-гігієнічних умов виробничого середовища.

3. На підприємствах групи А рівні відповідності чинним критеріям КМАФАНМ та *Enterobacteriaceae* у змивах з поверхні яловичих туш становлять відповідно 99,7 і 99,8 %, а на підприємствах групи Б зазначені критерії були перевищені щодо нормативних меж відповідно на 1,8 і 7,2 %.

4. Експериментально підтверджено, що на підприємствах груп А та Б після процесу нутрування рівень контамінації зовнішньої поверхні яловичих туш КМАФАНМ у середньому був вищим на 1,85 % щодо даних, отриманих після заключного туалету туш, а обсіменіння *Enterobacteriaceae* було вищим відповідно на 3,5 %, причому внутрішні поверхні черевної та грудної стінок туш були більш контаміновані зазначеними групами індикаторних мікроорганізмів порівняно з іншими досліджуваними ділянками поверхні туш.

5. За результатами дослідження встановлено, що кількість коліформних бактерій та *E. coli* на поверхнях шкур великої рогатої худоби на забійних підприємствах групи Б була більшою відповідно в 2,8 та 2,3 раза порівняно з кількістю цих бактерій на шкурах на підприємствах групи А.

6. Поверхні яловичих туш були в 1,5–1,7 раза менше контаміновані коліформними бактеріями та в 2,1–2,7 – *E. coli* на підприємствах групи А, ніж на підприємствах групи Б. Найбільш контамінованими коліформними бактеріями та *E. coli* до нутрування були поверхні яловичих туш в ділянках шії та стегна, а після нутрування – внутрішні поверхні грудної та черевної поверхонь.

7. Встановлено специфічність і охарактеризовано оригінальні олігонуклеотидні праймери до генів *stx2* та *eae* як засобів для молекулярно-генетичного аналізу (виявлення та ідентифікації) STEC, що стало основою для розроблення мультиплексного варіанта ПЛР тест-системи «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест».

8. Дослідження характерних маркерів патогенності розробленим методом ПЛР встановило, що серед 120 колоній *E. coli*, ізольованих з поверхні яловичих туш і шкур, наявність гена *stx2* та гена інтиміну (*eae*) було підтверджено в 5 ізолятів, а *stx2* гена – у 3, що є підставою для віднесення цих 8 ізолятів до STEC.

9. Із 8 встановлених STEC ізолятів 75 % (6 ізолятів) було отримано на підприємствах групи Б, що підтверджує безпосередній вплив рівня виробничої санітарії та гігієни на контамінацію поверхні яловичих туш як санітарно-показовими мікроорганізмами, так і STEC. У змивах з поверхні шкур було виявлено 4 STEC ізоляти, у змивах з поверхні туш – також 4 ізоляти, причому три з них було отримано після нутрування туш.

10. Експериментально встановлено, що за належних умов санітарії та гігієни під час первинної переробки яловичини узагальнені рівні контамінації їх поверхонь *Enterobacteriaceae* та *E. coli* становлять відповідно 45–50 і 15–20 КУО/см², що може слугувати додатковими критеріями гігієни виробництва, а перевищення цих значень свідчить про можливе обсіменіння туш STEC.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Запропоновано науково обґрунтовану систему заходів для контролю за STEC під час первинної обробки яловичих туш, до складу якої входять: дослідження виробничої санітарії та гігієни за використання таких критеріїв, як кількість коліформ та *E. coli*, порядок оцінки отриманих результатів, коригувальні дії та ПЛР-тест-система. Застосування запропонованої системи

заходів сприяє ефективному виробничому та ветеринарно-санітарному контролю, а також простежуваності у ланцюгу від виробничого процесу до столу споживача і забезпечує відповідність вітчизняної яловичини сучасним вимогам безпечності.

2. Запропоновано тест-систему «*E. coli shiga toxin* – ПЛР-Тест» для виявлення ДНК шигатоксинпродукуючих *E. coli* мультиплексним варіантом методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

3. При здійсненні офіційного контролю виробництва яловичини на відповідність вимогам харчового законодавства запропоновано «Методичні рекомендації щодо застосування систем простежуваності для контролю безпечності харчових продуктів у харчовому ланцюгу», які також будуть корисними для спеціалістів державних лабораторій ветеринарної медицини, науковців, викладачів та студентів ветеринарних факультетів і факультетів харчових технологій.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Єфімова О. М. Аналіз даних про мікробіологічні ризики в імпортованій до України продукції тваринного походження / **О. М. Єфімова**, В. В. Касянчук // Ветеринарна медицина України. – 2013. – № 11. – С. 30–32. *(Дисертант брала участь у проведенні досліджень і підготовці роботи до друку)*.

2. Бергілевич О. М. Маркери патогенності *E. coli* O157: H7 та основні гени-мішені для діагностики цього мікроорганізму в яловичині ПЛР тест-системою / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук, **О. М. Єфімова** // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. – 2014. – Вип. 28. – Ч. 2. – С. 188–192. *(Дисертант брала участь у проведенні досліджень щодо аналізу маркерів патогенності *E. coli* O157: H7 і підготовці роботи до друку)*.

3. Єфімова О. М. Аналіз мікробіологічної безпечності національної продукції тваринного походження, призначеної для експорту / **О. М. Єфімова**, В. В. Касянчук // Ветеринарна медицина України. – 2014 – № 1. – С. 30–34. *(Дисертант брала участь у проведенні досліджень і підготовці роботи до друку)*.

4. Система простежуваності – сучасна технологія контролю в харчовому ланцюгу для підвищення рівня безпечності харчових продуктів / [Касянчук В. В., Бергілевич О. М., **Єфімова О. М.**, Ротаєнко Ю. М.] // Ветеринарна медицина України – 2015. – № 2. – С. 26–29. *(Дисертант брала участь у проведенні аналізу літературних даних і підготовці роботи до друку)*

Статті у наукових фахових виданнях України,

включених до міжнародної наукометричної бази даних:

5. Єфімова О. М. Інтеграція ветеринарного контролю України до ризик-орієнтованого підходу у міжнародній торгівлі відповідно до вимог СОТ та ЄС / **О. М. Єфімова** // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2014. – Вип. 1 (34). – С. 43–48.

6. Єфімова О. М. Визначення загальних коліформ та *E. coli* як індикаторів дотримання ветеринарно-санітарних вимог при виробництві сирової яловичини / О. М. Єфімова // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2015. – Вип. 1 (36). – С.

7. Виявлення та ідентифікації шига-токсин-продукуючих штамів бактерій *E. coli* методом полімеразної ланцюгової реакції / [Касянчук В. В., Ушкалов В. О., Бергілевич О. М., Дерябін О. М., **Єфімова О. М.**, Козій Р. В.] // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2015. – Вип. 7. (37). – С. 121–124. *(Дисертант брала участь у проведенні досліджень, у розробленні ПЛР тест-системи та підготовці роботи до друку).*

**Стаття у науковому виданні України,
включеному до міжнародної наукометричної бази даних:**

8. Ветеринарно-санітарний контроль мікробіологічних показників яловичих туш та санітарних умов їх виробництва / [Касянчук В. В., **Єфімова О. М.**, Бергілевич О. М., Скляр О. І., Кустуров В. Б.] // ScienceRise. – 2015. – № 1(3). – С. 49–56. – Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/jpdf/texc_2015_1\(3\)_10.pdf](http://nbuv.gov.ua/jpdf/texc_2015_1(3)_10.pdf). *(Дисертант брала участь у визначенні санітарно-гігієнічних показників при виробництві яловичини та у підготовці роботи до друку).*

Методичні рекомендації:

9. Методичні рекомендації щодо застосування систем простежуваності для контролю безпечності харчових продуктів в харчовому ланцюгу / [Касянчук В. В., Бергілевич О. М., Новожицька Ю. М., Марченко А. М., **Єфімова О. М.**, Ротаєнко Ю. М.]. – К.: ДНДІЛДВСЕ, 2014. – 34 с. *(Розглянуто на науково-методичній раді Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25.12.2014 р. Дисертант брала участь у проведенні досліджень і підготовці методичних рекомендацій до друку)*

Матеріали та тези наукових доповідей:

10. Єфімова О. М. Проблеми безпечності національної м'ясної продукції для експорту / О. М. Єфімова // Матеріали науково-практичної конференції викладачів, аспірантів та студентів Сумського національного аграрного університету, 14–18 квітня 2014 р. – 2014. – Т. 2. – С. 43.

11. Ефимова О. Н. Сравнительный анализ результатов ветеринарно-санитарного контроля пищевых продуктов, не соответствующих для международной торговли по показателям безопасности / О. Н. Ефимова // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: XVII Международная научно-практическая конференция УО БГСХА, 20–30 мая 2014 г. – Горки, 2014. – С. 81–91.

АНОТАЦІЯ

Єфімова О. М. Науково-експериментальне обґрунтування методу визначення STEC для ветеринарно-санітарного контролю яловичини. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.09 – ветеринарно-санітарна експертиза. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена вивченню впливу виробничої гігієни та санітарії на мікробіологічну безпеку яловичини для експорту, що є актуальною проблемою на шляху просування України на міжнародні ринки. Ветеринарно-санітарний контроль під час первинної переробки яловичини потребує вдосконалення. На основі органолептичних, ветеринарно-санітарних, мікробіологічних, молекулярно-біологічних показників встановлено вплив рівня гігієни та санітарії на відповідність яловичини офіційним критеріям виробничої гігієни (КМАФАНМ, бактерії родини *Enterobacteriaceae*). Вивчено вплив рівня виробничої гігієни та санітарії на кількісні показники загальних коліформ та *E. coli* у змивах з поверхні яловичих туш.

Встановлено взаємозв'язок між кількісними значеннями КМАФАНМ, *Enterobacteriaceae*, загальних коліформних мікроорганізмів, *E. coli* у змивах з поверхні яловичих туш та рівнем обсіменіння їх STEC. Розроблено науково обґрунтовані межові значення кількості загальних коліформних мікроорганізмів, *E. coli* як цільових мікроорганізмів для ветеринарно-санітарного та виробничого контролю рівня гігієни і санітарії. Розроблено ПЛР-метод ідентифікації STEC для гарантування безпечності яловичини. Експериментально встановлено додаткові оптимальні критерії для коліформ та *E. coli* – відповідно 45–50 і 15–20 КУО/см² для використання в санітарній програмі підприємств із виробництва яловичини.

Ключові слова: ветеринарно-санітарний контроль, яловичина, змиви з туш, загальні коліформні мікроорганізми, *E. coli*, STEC.

АННОТАЦИЯ

Ефимова О. Н. Научно-экспериментальное обоснование метода определения STEC для ветеринарно-санитарного контроля говядины. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.09 – ветеринарно-санитарная экспертиза – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена изучению влияния производственной гигиены и санитарии на микробиологическую безопасность говядины для экспорта, что является актуальной проблемой на пути продвижения Украины на международные рынки. Ветеринарно-санитарный контроль при первичной обработке говяжьих туш требует усовершенствования. На основании органолептических, ветеринарно-санитарных, микробиологических, молекулярно-биологических показателей

установлен уровень соответствия говядины официальным национальным микробиологическим критериям; установлено влияние уровня гигиены и санитарии на соответствие говядины официальным критериям производственной гигиены (КМАФАНМ, бактерии семейства *Enterobacteriaceae*). Изучено влияние уровня производственной гигиены и санитарии на количественные показатели общих колиформ и *E. coli* в смывах с поверхности говяжьих туш.

Установлена взаимосвязь между количественными значениями КМАФАНМ, *Enterobacteriaceae*, общих колиформных микроорганизмов, *E. coli* в смывах с поверхности говяжьих туш и уровнем обсеменения их STEC. Разработаны научно обоснованные предельные значения количества общих колиформных микроорганизмов, *E. coli* как целевых микроорганизмов для ветеринарно-санитарного и производственного контроля уровня гигиены и санитарии. Разработан ПЦР – метод идентификации STEC для обеспечения безопасности говядины. Экспериментально установлено оптимальные критерии для колиформ и *E. coli* которые имеют значения соответственно 45–50 и 15–20 КОЕ/см² для использования в санитарной программе предприятий по производству говядины на экспорт.

Ключевые слова: ветеринарно-санитарный контроль, говядина, смывы с туш, колиформные микроорганизмы, *E. coli*, STEC.

ANNOTATION

Efimova O. M. Scientific and experimentative basis of method for STEC determination for veterinary and sanitary control of beef. – The manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Veterinary sciences, specialty 16.00.09. – veterinary and sanitary expertise. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to studying the impact of production hygiene and sanitation indicators for microbiological safety of export intended raw beef in order improve the veterinary control in beef carcasses primary processing. On the basis of organoleptic, veterinary and sanitary, microbiological and molecular biological research there has been defined the level of raw beef compliance with the national official microbiological criteria; the level of hygiene and sanitation influence on raw beef compliance with the official microbiological criteria for production hygiene (AMFAnM, *Enterobacteriaceae*) has been defined. The influence of production hygiene and sanitation level on quantitative indexes of coliforms and *E. coli* in their lavage from beef carcasses surface. The retrospective statistical analysis of national official laboratory studies found out that in 2012–2013 the main reason of international trade (export/import) intended beef incompliance was the exceeded AMFAnM rate and EBG detection, that made up an average of 33,9 and 21,9 % respectively which is the evidence of production hygiene and sanitation rules. There has been determined that the level of inner surfaces contamination with AMFAnM and abdominal inner wall contamination with *Enterobacteriaceae* were significantly higher than those in all the other parts of the carcass ($P < 0.05$). Under following the sanitary hygienic requirements

at enterprises producing raw beef production the hygiene criteria for production process of AMFAnM and *Enterobacteriaceae* reach the upper regulatory limit.

A direct proportional relationship between quantitative values of AMFAnM, *Enterobacteriaceae*, general coliform microorganisms, *E. coli* in beef carcasses surface lavages, the sanitation and hygiene level, as well as the level of epy carcasses surface contamination with STEC. The research results indicate the possibility of using the results of determining the number of general coliforms and *E. coli* as indicators under determining the sanitation and hygiene level in primary processing of beef carcasses after the slaughter and predicting presence/absence of STEC in raw beef.

Specificity of original oligonucleotide primers for *stx2* gene and (*eae*) gene was determined as an instrument for molecular genetic analysis. The scientific based boundary values have been developed for the total number of coliform microorganisms, *E. coli* as target microorganisms introduced for veterinary sanitation and production control of hygiene and sanitation level.

Together with a group of authors developed A PCR method for STEC identification to ensure raw beef safety has been developed in cooperation with the group of the authors.

Among the 120 *E. coli* colonies isolated from the surface of beef carcasses and skins, the presence of the *stx2* gene and intimine (*eae*) gene was confirmed in 5 of them by PCR method and 3 isolates were confirmed to the *stx2* gene which are typical markers for classification the 8 isolates as STEC. It has been found out that large amounts of general coliforms and *E. coli* (more than 45–50 ACU/cm²; 15–20 ACU/cm² respectively) on beef carcasses surfaces of is the basis to foresee the STEC presence in their composition, which can cause serious food poisoning in humans.

It has been found out that companies supplement the control in the 2 key points of the industrial process of carcasses initial processing to provide raw beef meeting the requirements for international standards: after evisceration and the final washing the carcasses. The STEC control can be complemented by testing for indicator organisms as *Enterobacteriaceae* or total coliforms, which is recommended as a means of monitoring process control, effectiveness of interventions applied and adherence to GMPs on a regularly basis. We has instituted a change in the standard sanitary operating procedures (SSOPs) at the high risk stages of production to improve on its overall intervention strategy to prevent fecal material to contaminating the carcass. Sampling strategy applied for strategic points in the process and the use of microbiological testing as a verification tool to demonstrate the efficacy of the control measures put in place to address STEC are recommended. Monitoring programs should include a system to record data and their evaluation, (performing trend analyses). This sampling plan was based a risk-analis approach such as seasonality research data. Generic *E. coli* can be a useful indicator to verify process control since it is ubiquitous in feces, and rapid enumeration test kits are available. Data analysis to determine patterns (or «trends») can be useful in determining situations where a potential loss of control is likely to occur. Data analysis should be used with a company as part of the overall food safety system and the traceability system. If non-intact beef carcass are found to be associated with a positive STEC result, the operator must notify in the

official veterinary organization immediately and take appropriate corrective and preventative measures. Using the developed complex veterinary and sanitary measures is essential on traceability in every link of the chain, «from farm – to the table».

Key words: raw beef, carcasses lavage, general coliformis, microorganisms, STEC.