

УДК 619:616.98:578

Власенко В.В., доктор біологічних наук, професор  
Печенюк О.В., магістрант  
Матіїшина М.В., магістрант  
Гавриш А.М., магістрант  
Вінницький національний аграрний університет

## **ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ КОМП'ЮТЕРНИХ ТЕХНОЛОГІЙ ЩОДО БЕЗПЕЧНОСТІ МОЛОЧНОЇ СИРОВИНИ ПРИ ВИРОБНИЦТВІ СИРІВ**

*В роботі досліджується сучасний стан та перспективи покращання якості і безпеки молочної сировини в Україні. Запропоновано нові підходи до удосконалення контролю якості безпеки молока з використанням комп'ютерних технологій та нових поживних середовищ.*

**Ключові слова:** корови, молоко, якість і безпека, поживні середовища, комп'ютерна діагностика.

Відповідно до сучасних міжнародних вимог, щодо безпеки молока лише якісний контроль є вже недостатнім тому, що він не може гарантувати повну безпеку. Особливо критична ситуація склалася з оцінкою якості молока від тубінфікованих тварин на територіях забруднених радіонуклідами. Для виявлення тубінфікованих корів використовують туберкулін для ссавців.

Як відомо, туберкулін є алергеном, який виготовляють з високовірулентного (патогенного) штаму збудника туберкульозу. За повідомленням фахівців ветеринарної медицини: Ю. Колоса (канд. вет. наук), О. Якубчак та В. Хоменко (доктори наук, професори), М. Зелінського (головний спеціаліст Держдепартаменту вет. медицини), а також В. Титаренко (заступник директора Держптаховетцентр м. Київ) та інших, цитую: «Туберкулін є алергеном, тобто при потраплянні у сенсibiliзований організм викликає певну алергічну реакцію. Щоб вона була специфічною, в алергені (туберкуліні) повинні бути білки збудника туберкульозу. Крім того, в даному препараті можуть бути фільтрувальні форми мікобактерій. Для того щоб вони не розвивалися і не переходили у вегетативні форми, до препарату додають консерванти (фенол, гліцерин тощо). Отже, такий препарат є специфічним алергеном. Якщо вивільнити його від фільтрувальних форм мікобактерій, то він втрапить свою специфічність і буде непридатним до використання. Природно, що, нейтралізувавши консервант та провівши посіви на спеціальні високочутливі середовища — ВКГ зі стимулятором росту чи інше специфічне і високочутливе — можна досягти реверсії фільтрувальних форм у вегетативну форму мікобактерій» [1]. Отже, як повідомляють автори [1], при туберкулінодіагностиці тварин, в організм вводять фільтруючі форми вірулентного збудника туберкульозу, а відтак цей збудник розвивається і з організму корів виділяється в значні кількості з молоком корів. Існуючі бактеріологічні методи визначення збудника цієї небезпечної хвороби в продуктах харчування досить складні та тривалі. Це заважає оперативному визначенню тубінфікованого сирого молока. Відомо, що для туберкульозу та багатьох антропозоонозних захворювань існує біологічний ланцюг "тварина—молоко—людина", тобто в разі недостатнього контролю

продукти харчування тваринного походження, уражені збудником туберкульозу, можуть передавати збудника (інфекцію) людям [2].

Ситуація із здоров'ям населення України набуває загрозливого стану, загострилась і епідеміологічна ситуація з туберкульозу. Щороку в Україні виявляється 30-40 тис. хворих на туберкульоз, загальна кількість тих, хто перебуває під наглядом лікувально-профілактичних закладів, становить близько 700 тис. осіб, у т.ч. хворих на активні форми туберкульозу — 140 тисяч. За період з 1990 по 2005 рік захворюваність на туберкульоз органів дихання зросла в 2,4 раза [3]. В 1995 році рішенням ВООЗ в нашій країні було оголошено про епідемію туберкульозу. Слід зазначити, що від цього захворювання щорічно в Україні помирає 10-12 тис. людей. [1].

Вступ України до СОТ зобов'язує нас виконувати Постанову (ЄС) № 178/2002. Дія постанови поширюється на всі країни ЄС. Мета постанови (ЄС) № 178/2002 - створення основ для високого рівня захисту здоров'я людини та споживчих інтересів в галузі продуктів харчування, беручи до уваги різноманіття асортименту харчових продуктів. Це стало передумовою для створення міцної наукової основи для розпізнавання в сирому молоці стадійного розвитку збудника туберкульозу після проведення туберкулізації у дійних корів.

Метою нашої роботи було підтвердити чи виключити наявність фільтруючих форм мікобактерій в туберкуліні ППД для ссавців і можливість інфікування ним молочної сировини та розробити експрес-методу оцінки безпеки молока з використанням комп'ютерної системи для виявлення збудника туберкульозу.

**Матеріал та методи.** Для визначення ефективності комп'ютерної оцінки біологічної безпеки молочної сировини використовували культури мікобактерій: *M. tuberculosis* H37 Rv (з колекції ГИСК ім. Л.А.Тарасевича), *M. bovis* 8, *M. bovis* BCG, які відновили з ліофілізованого стану спочатку на середовищі Левенштейна-Йенсена, потім - на середовищі Павловського.

Гомогенізовані культури суспензували в стимуляторі росту до концентрації 1 мг/мл, потім готували розведення (1 : 10) і ставили в термостат при температурі 37-38°C на 48 год, з наступним посівом на поживне середовище «Влакон».

В якості біологічної моделі використовували морські свинки, які розділили на дві групи. Перша група слугувала контролем, а друга – дослідом. В роботі використовували туберкулін ППД для ссавців Сумської біофабрики серія 45 та 80, який вводили морським свинкам другої (дослідної групи), що пройшли карантин, внутрібрюшино в кількості 3 мл на стерильному мінеральному маслі і через місяць цим тваринам проводили евтаназію. Для виявлення інфікованості піддослідних тварин, відбирали печінку, селезінку та легені морських свинок і висівали на поживні середовища. Суспензію внутрішніх органів обробляли 10% розчином трьохзаміщеного фосфорнокислого натрію. Для виявлення фільтруючих форм (артроспор) збудника туберкульозу використовували бактеріальний фільтр Millpore з діаметром 0,22 мікрона. До отриманого фільтрату додавали стимулятор росту ВКГ, після чого інкубували в термостаті 24 год при температурі 37°C. Культуральні і бактеріологічні дослідження проводили згідно Наказу МОЗ України № 45-2002 року [4].

Проводили відбір молока від корів, що реагували позитивно на туберкулін по загальноприйнятій методиці. В пробірки з молоком в кількості 10 мл додавали 2-3 краплі 5% розчину фенолу з метою інгібування росту супутньої мікрофлори. При дослідженні молока використовували збагачення препаратом ВКБ. Запропонований

метод збагачення препаратом ВКБ (Власенко В., Конопко І., Березовський І., 2003) дає можливість концентрувати збудник туберкульозу. Метод полягає в тому, що до молока в кількості 10 мл додають таку ж кількість препарату ВКБ ) і підігрівають до 50-60°C. Після охолодження вміст виливають в центрифужні пробірки, центрифугують при 1500 об/хв протягом 25-30 хвилин, надсадну рідину зливають, а з осаду роблять бактеріологічні посіви та тонкі мазки, які висушують, фіксують та фарбують за методом Ціль-Нільсена. При бактеріологічному дослідженні до осаду додавали стимулятор росту в співвідношенні 1:1 і ставили в термостат при температурі 37-38°C на 48 год, з наступним посівом на поживне середовище «Влакон». Мікроскопію мазків проводили за загальноприйнятою методикою за допомогою імерсійної системи з використанням комп'ютерних технологій мікроскопування, яка запатентована нами в Україні.

**Результати досліджень.** Встановлено, що інокуляція матеріалу (туберкуліну), який містить фільтруючі форми МБТ (відсутність росту на традиційних поживних середовищах і ріст на середовищі ВКГ та Влакон), в макроорганізмі морських свинок за короткий час (один місяць після зараження) розвиток патологічних характерних змін для туберкульозу спостерігалось лише у 8% тварин, а при бактеріологічному дослідженні у всіх тварин, яким вводили туберкулін виявляється збудник туберкульозу, тоді як на посівах контрольної групи тварин ріст був відсутній, а патологічні зміни не спостерігались. Результати визначення ефективності комп'ютерної оцінки біологічної безпеки молочної сировини наведені в табл. 1.

*Таблиця 1. Результати порівняльних методів досліджень*

Назва дослідного матеріалу	К-сть проб	Результати мікроскопії				Бактеріологічні дослідження (ріст)			
		Світлова мікроскопія		Комп'ютерна		Середовище Левенштейна - Йенсена		Середовище «Влакон»	
		Факт	%	Факт	%	Факт	%	Факт	%
M. tuberculosis H37 R v	5	5	100	5	100	5	100	5	100
M. bovis 8	10	10	100	10	100	10	100	10	100
M. bovis BCG	10	10	100	10	100	10	100	10	100
Молоко інфікованих корів збудником туберкульозу	10	1	10	10	100			10	100

Як видно з табл. 1, результати мікроскопічних і бактеріологічних досліджень тест-культур з середовища Павловського різниці не мали, а при дослідженні мазків молока світловим мікроскопом виявилось позитивних мазків лише 10%, тоді як при комп'ютерній мікроскопії-100%. Культури отримані на середовищах Влакон і Левенштейна - Йенсена за мікроскопічною картиною були ідентичні. Після посіву досліджуваних проб через 2-4 доби на досліджуваному середовищі з'являлися круглі

напівпрозорі дрібні колонії сіро-білих кольорів, іноді - з жовтуватим відтінком, що легко знімаються із середовища при приготуванні мазків. В процесі перегляду мазків з колоній, що виростили на 2-4 добу на досліджуваному середовищі, виявлені поліморфні форми: дрібні коки та палички різної величини, прямі й вигнуті, із зернистістю (при фарбуванні по Ціль - Нільсену - від рожевого до червоно-фіолетових кольорів). Тобто ріст культур з молока корів інфікованих збудником туберкульозу на середовищі «Влакон» був в 100% досліджуваних проб, а на середовищі Левенштейна - Йенсена - відсутній. Отже, можна думати, що малахітовий зелений який входить в склад середовища Левенштейна - Йенсена інгібує ріст не лише супутньої мікрофлори, але і збудника туберкульозу, який має понижено ферментативну активність. При перегляді мазків культур, вирощених на досліджуваному середовищі протягом 1,5 міс. і пофарбованих по Ціль - Нільсену, виявлені розсипи коків, ди - і тетракоків, у великій кількості - палички різної величини із зернистістю, а також інші форми червоних кольорів.

Таким чином, при культивуванні мікобактерій на досліджуваному середовищі підтверджена їхня здатність трансформуватися в класичні палички.

При комп'ютерній мікроскопії мазків з молока корів, що реагували позитивно на туберкулін, спостерігали клітини рожево-червоного кольору: коки, дрібні й великі, палички короткі і довгі із зернами, прямі на вигнуту.

Для запобігання хибних результатів при проведенні бактеріоскопії виникає необхідність оцінити наявність живих мікобактерій в мазку, так як вони не фарбуються за методом Ціль-Нільсена, а тому дуже важливо визначити життєздатність мікобактерій. З цією метою приготуваний мазок молока від вищезгаданих корів фіксували над полум'ям, фарбували 1,0% розчином малахітового зеленого (рН 4,1) протягом 10 хвилин, підігрівачи мазок до появи пари. Після цього фарбу зливали, мазок промивали водою і фарбували карболовим фуксином (в розведенні 1:5) протягом 5 хвилин. Живі мікобактерії фарбуються в зелений колір, а нежиттєздатні — в червоний.

Для підтвердження того, що з молока виділена культура збудника туберкульозу була проведена біологічна проба на морських свинках. В процесі проведеної біологічної проби виявлено здатність отриманих культур з молока визивати характерні туберкульозні патологоанатомічні зміни у лабораторних тварин та виділити з них збудника туберкульозу на середовищі Левенштейна - Йенсена без малахітового зеленого. Таким чином, підтверджена гіпотеза, що малахітовий зелений, інгібує не лише ріст супутньої мікрофлори, а і збудника туберкульозу, який має понижено ферментативну активність, проте за сприятливих умов здатний викликати захворювання.

В результаті проведених досліджень встановлено, що всі досліджувані мазки молока від корів, які реагували на введений туберкулін позитивно мали в 100 полях зору мікроскопа від 7 до 43 клітин збудника туберкульозу. Можна думати, що при фіксації над полум'ям спиртівки мазків молока мікобактерії не гинуть остаточно, а тому погано фарбуються за методом Ціль - Нільсена. Впровадження у практику комп'ютерної мікроскопії та поживного середовища "Влакон" суттєво прискорить виявлення мікобактерій туберкульозу значно зменшить витрати на лабораторну діагностику при контролі безпеки молочної сировини для виробництва твердих сирів.

**Висновки.** 1. Основою гарантування безпеки молочної продукції в Україні є система моніторингу санітарно небезпечних збудників та залишкових кількостей токсичних речовин в молочних продуктах харчування.

2. Запропонований метод збагачення мікобактерій в сирому молоці препаратом ВКБ та результати комп'ютерної мікроскопії мазків молока, можуть бути використані як експрес-метод оцінки біологічної безпеки молочних продуктів.

3. Середовище "Влакон" придатне для контролю якості молока та молокопродуктів, так як дає можливість виявляти поліморфні форми збудника туберкульозу (фуксинофільні коковидні утвори, зернисті палички), які викликають специфічне туберкульозне ураження внутрішніх органів морських свинок.

4. Культури музейного штаму *M. bovis* 8, *M. bovis* BCG та з молока корів, інфікованих туберкульозом, отримані на середовищах Влакон і Левенштейна - Йенсена є ідентичні за мікроскопічною картиною.

5. Впровадження у практику комп'ютерної мікроскопії та поживного середовища "Влакон" суттєво прискорить виявлення мікобактерій туберкульозу значно зменшить витрати на лабораторну діагностику при контролі безпеки харчових продуктів.

6. Туберкулін ППД для ссавців Сумської біофабрики серія 45 та 80 містить живого збудника туберкульозу і після введення в організм він може визвати характерні патологічні зміни лише у 8% випадків, а при бактеріологічному дослідженні у всіх тварин, яким вводили туберкулін виявляється збудник туберкульозу, що є вкрай небезпечним для харчової сировини.

---

### Література

1. Колос Ю., Стець В., Титаренко В., Зелінський М., Якубчак О., Хоменко В. До питання діагностики туберкульозу в тварин// Ветеринарна медицина України - 2006- №11-С. 10-12.
  2. Власенко В.В. Туберкульоз в фокусе проблем современности. - Винница: Наука. - 1998.- 223 с.
  3. Власенко В.В., Власенко И.Г., Василенко С.П., Колодий С.А., Лысенко А.П. Патоморфологические реакции, вызванные артроспорами микобактерий туберкулеза // Вісник морфології -2006- №12(1).- С. 46-48.
  4. Методичні рекомендації «Мікробіологічні методи обстеження хворих на туберкульоз».(на підставі нових даних про особливості біологічного розвитку *M. tuberculosis* ). МОЗ. Київ – 2001. - 23 с.
- 

### Summary

**Prospects for the use of computer technologies, the safety of raw milk cheeses in the production / Vlasenko V.V., Pecheniuk O.V., Matiyishyna M.V., Gavrish A.M.**

In work the modern state and prospects of improvement of quality and safety of milk in Ukraine is explored. Offered new approaches to the improvement of quality and safety of milk from the use of computer technologies and new nourishing environments.

**Keywords:** cows, milk quality and safety, food protection, computer diagnostics.