НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

ДІАГНОСТИКА ФУЗАРІОЗІВ ЗЕРНА МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР)

Київ – 2024

УДК 619:616.98:579.869.2-08:636.4
DOI: 10.31073/vet_biotech.meth2025.04

Розглянуто та схвалено науково-методичною комісією ІВМ НААН (протокол № 2 від 07.11.2024 р.).

Затверджено на засіданні Вченої ради Інституту ветеринарної медицини НААН (протокол № 11 від 07.11.2024 р.).

Укладачі: **Куцан О. Т.**, доктор ветеринарних наук;
Тарасов О. А., кандидат ветеринарних наук;
Криця Я. П., кандидат ветеринарних наук;
Захарова О. М., кандидат біологічних наук;
Янголь Ю. А.;
Сидоренко Т. В.

Рецензенти: **Ситюк М. П.**, доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник; завідувач лабораторії вірусних хвороб тварин Інституту ветеринарної медицини НААН

Уховський В. В., доктор ветеринарних наук, професор, завідувач відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Діагностика фузаріозів зерна методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) : метод. рек. / Куцан О. Т, Тарасов О. А., Криця Я. П., Захарова О. М., Янголь Ю. А., Сидоренко Т. В. Київ : ІВМ НААН, 2024. 22 с. DOI: https://doi.org/10.31073/vet_biotech.meth2025.04

Методичні рекомендації для ветлікарів господарств, спеціалістів регіональних державних лабораторій ветеринарної медицини, науковців, аспірантів, викладачів вищих навчальних закладів 3–4 рівнів акредитації зі спеціальності 6.130501, 8.130501 – «Ветеринарна медицина».

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів ветеринарної медицини та містять інформацію щодо виявлення грибів роду Fusarium в зерні із використанням полімеразної ланцюгової реакції.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, СИМВОЛІВ

ВКЗ	– внутрішній контрольний зразок
ГХК	– геморагічна хвороба кролів
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
EBHSV	– вірус синдрому європейського зайця
EDTA	– етилендиамінтетраоцтова кислота
ЗТ-ПЛР	– зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція
кДНК	– комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
мкл	– мікролітр
НКЗ	– негативний контрольний зразок
ПКЗ	– позитивний контрольний зразок
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ПЛР-РЧ	– полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу
ДНК	– рибонуклеїнова кислота
LAMP	– петлева ізотермічна ампліфікація ДНК/ДНК
RT-LAMP	– петлева ізотермічна ампліфікація ДНК/ДНК зі зворотною транскрипцією
RHDV	– вірус геморагічної хвороби кролів
с	– секунда
см	– сантиметр
тис. об./хв.	– тисяч обертів за хвилину
хв	– хвилина
°С	– градус Цельсія

ВСТУП

Ураження зерна та кормів грибами-продуцентами мікотоксинів є актуальною, оскільки згідно даних літератури мікотоксикози тварин є досить поширеними не тільки в Україні, але й в усьому світі. Важливість проблеми обумовлюється також підвищеними ризиками для людей через вживання контамінованих продуктів тваринництва або зерна [1, 2]. Гриби роду *Fusarium* відомі як продуценти небезпечних токсинів [3-5].

Серед факторів зовнішнього середовища, які впливають на організм тварин і птиці, велика увага приділяється продуктам метаболізму мікроскопічних плісеневих грибів – мікотоксинам. Проблема мікотоксикозів носить глобальний характер. У першу чергу це пояснюється значним розповсюдженням грибів у природі, які за сприятливих умов уражають корми, продукти харчування, промислову сировину та продукують особливо небезпечні мікотоксини. З іншого боку - використання кормів і продуктів харчування, контамінованих мікотоксинами, може супроводжуватись захворюваннями людей і тварин – мікотоксикозами і навіть призводить до їх загибелі [6].

Токсигенні плісеневі гриби та їх метаболіти, уражаючи корми, викликають у тварин і птиці комплексні отруєння різного ступеня від гострих до хронічних. При цьому відмічають зменшення продуктивності, погіршення санітарної якості продукції, зниження природної резистентності та імунного статусу і, як правило, підвищення захворювань інфекційної і незаразної етіології.

Швидкому поширенню грибів на рослинних кормових субстратах сприяють їх біологічні особливості : гіфальна форма росту, яка забезпечує їх контакт з живильним середовищем, високий рівень адаптації і біохімічної активності, поліморфізм, наявність лабільної системи генетичної і негенетичної мінливості, утворення біологічно активних речовин, висока енергія розмноження [7, 8, 9].

Реальною загрозою для більшості свино – і птахогосподарств є забруднення зерна мікотоксинами: афлатоксинами, фузаріотоксинами (Т-2 токсином, зеараленоном, дезоксиніваленолом, фумонізинами). Ураження зерна мікотоксинами відбувається в період дозрівання його на полі (Т-2 токсин, зеараленон, дезоксиніваленол, фумонізини), а при зберіганні – афлатоксини, охратоксини. Під час зберігання зерна в несприятливих умовах можливе повторне забруднення його фузаріотоксинами, яке іноді перевищує

початкове ураження. Зерно, що піддалося самозігріванню, в усіх випадках уражене аспергілами, серед яких великий відсоток (до 40%) складають токсиноутворюючі види грибів. Самозігрівання відіграє провокуючу роль у накопиченні мікотоксинів під час зберігання зерна в районах з помірним кліматом (Кіровоградська, Черкаська і Одеська області). При підвищеній температурі в процесі самозігрівання виникають умови, за яких можливий розвиток токсигенних грибів і синтез мікотоксинів. В цей період на зерні переважає ріст відносно термостабільних грибів родів *Aspergillus, Penicillium, Mucor, Alternaria, Rhizopus, Fusarium, Trichoderma* та інші [5].

На місці самозігрівання зерна температура зменшується від центру до периферичних шарів. Вологість зернової маси має зворотнє спрямування. За таких умов різноманітні види грибів розподіляються у зерновій масі відповідно до їхніх екологічних вимог. Афлатоксини забруднюють, в основному, поверхневі шари зернової маси. Інтенсивність накопичення мікотоксинів у зерні залежить від поєднання багатьох чинників, зокрема вологості, температури, аерації і засмічення.

Найнебезпечніші фітопатогенні токсиноутворюючі гриби роду *Fusarium*, які впливаючи на генеративні органи злакових культур, не тільки уражають зерно і забруднюють його мікотоксинами в період вегетації, а і продовжують розвиток на зерні при зберіганні, збільшуючи вміст в ньому фузаріотоксинів. Всі фузаріотоксини володіють чітко вираженою антибіотичною дією по відношенню до потенційних конкурентів, що і сприяє підвищенню токсигенності фузаріїв [10, 11].

Встановлено, що штами збудника фузаріозу колосу ніколи не виділяються у представників диких злаків. Тільки рослини високопродуктивних сортів пшениці індукують високу токсигенність фузаріїв і підтримують штами-суперпродуценти фузаріотоксинів. Токсигенність штамів підвищується при переході з одного сорту на інший, а також при зміні субстрату (з рису на кукурудзу, пшеницю). Це пояснюється тим, що виражене токсиноутворення – адаптивна ознака, оскільки неживий харчовий субстрат завжди приваблює велику кількість мікроорганізмів-конкурентів [12].

За даними літератури, майже в половині зернової продукції виявляють грибну контамінацію, що за порушення умов зберігання викликає накопичення токсинів, які є стабільними. За даними літератури до 15% ураженого фузаріями зерна також містило фумонізини в гарнично допустимих кількостях [13-14].

Підвищені ризики для тваринницьких господарств України полягають в високій поширеності токсинпродукуючих грибів в довкіллі, значному зниженні продуктивності тварин та якості продукції за мікотоксикозів, що викликають афлатоксин, фузаріотоксин, стеримгматоцистин, фумонізини, Т-2 токсин, вомітоксин тощо [15-16].

Під час дозрівання зерна на полі за наявності сприятливих умов довкілля (температура, вологість, кількість опадів) відбувається накопичення концентрацій різних типів токсинів, в тому числі фумонізинів, які продукуються грибами роду фузаріум [17-19].

В звязку із тим, що сьогодні важливо попередити контамінацію мікроскопічними грибами зернової продукції, своєчасне виявлення продуцентів мікотоксинів є важливим заходом для профілактики накопичення токсинів в зерні під час зберігання.

Молекулярно-генетичні методи – це велика та різноманітна група, призначена для виявлення варіацій у структурі ділянки ДНК для розшифровки первинної послідовності нуклеотидних залишків. В основі цих методів лежать генно-інженерні маніпуляції з ДНК та ДНК. Вихідним етапом всіх молекулярно-генетичних методів є отримання зразків нуклеїнових кислот. Можливість проведення молекулярно-генетичного аналізу з незначною кількістю легкодоступного біологічного матеріалу є перевагою методів цієї групи [20 -27].

У сучасних умовах для виявлення мікотоксинів використовують складні методи – ВЕРХ та ІФА [21–23].

Застосування нових молекулярно-біологічних методів (зокрема полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР) дозволяє визначати токсин-продукуючі мікроскопічні гриби з високим ступенем достовірності та за короткий проміжок часу, що важливо для запобігання контамінації кормів мікотоксинами та забезпечення якості кормів та продукції тваринництва.

1. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) Принцип методу

Класичним варіантом постановки ПЛР є типова модифікація реакції, що складається із кількох етапів екстракцією ДНК, ампліфікацією з наступною візуалізацією ампліконів за методом електрофорезу в агарозному гелі на ТВЕ-буфері.

В основі реакції лежить три етапи , а саме:

- денатураця молекули ДНК;
- гібридізацію («відпал») олігонуклеотидних праймерів та зондів, які мічені флуоресцентними барвниками;
- синтез комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Taq-полімерази.

Під час використання ПЛР у класичному форматі детекцію ампліконів здійснюють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Результат детекції фотографують або сканують і архівують у пам'яті комп'ютера. Метод не передбачає кількісного визначення.

Переваги методу ПЛР як методу діагностики:

1. Пряме визначення наявності збудника;
2. Висока чутливість та специфічність;
3. Універсальність процедури виявлення різних збудників;
4. Швидкість одержання результатів аналізу;
5. Можливість виявлення навіть дуже малих кількостей збудника.

Обмеження методу ПЛР:

1. Можливість перехресної реакції;
2. Ампліфікується ДНК як живого, так ізагиблого мікроорганізму;
3. Ризик контамінації зразків або реакційної суміші.

Полімеразна ланцюгова реакція зарекомендувала себе як достатньо чутливий та високоспецифічний метод діагностики інфекційних хвороб. Специфічність методу прямопропорційно залежить від консервативності геному чи ділянки геному збудника, яка взята для синтезування праймерів.

2. Сфера застосування методичних рекомендацій

Методичні рекомендації призначені для лабораторної діагностики фузаріозів зерна методом ПЛР.

3. Відбір патологічного та/або біологічного матеріалу і його підготовка для дослідження

При підготовці зразків для дослідження необхідно дотримуватися правил, що запобігають забрудненню об’єктів зовнішнього середовища та перехресному забрудненню зразків.

Пробопідготовка досліджуваного зразка передбачає його подрібнення та гомогенізацію за допомогою спеціального лабораторного обладнання (блендер, гомогенізатор, ступка, млинок) і приготування наважки.

Досліджуваний зразок гомогенізують з використанням гомогенізатора, роблять три послідовні помоли при 10 – 25 тис. об/хв, відбирають наважку, зважують у спеціальному одноразовому пластиковому контейнері від 50 до 200 мг зразка, згідно з інструкцією виробника до тест-системи для виділення ДНК і поміщають у дві одноразові пластикові мікропробірки типу Еппендорф об’ємом 2,0 см3. Маркером позначають реєстраційний код зразка, дату проведення випробування та підпис виконавця.

При дослідженні рідких на напіврідких матеріалів вміст кожної упаковки ретельно перемішують за допомогою одноразового шпателя. Потім відбирають від 50 до 200 мкл досліджуваного зразка, залежно від вибору діагностичного набору для виділення ДНК, переносять в одноразові мікропробірки типу Еппендорф об'ємом 2,0 см3 та ретельно перемішують (об'єднана проба). Пробу маркують і використовують для виділення ДНК.

При дослідженні матеріалів щільної консистенції відбирають наважки (по 5 – 10 г кожна), ретельно перемішують одноразовим шпателем, формуючи об’єднану пробу (50 – 100 г). Перед проведенням досліджень пробу подрібнюють до розмірів 1×1 см, та гомогенізують при 10 – 25 тис. об/хв. Для виділення ДНК використовують наважку від 50 до 200 мг матеріалу, згідно з інструкцією до тест-системи.

Мікропробірку з подрібненим зразком поміщають у закритий контейнер і переносять у зону виділення ДНК.

4. Обладнання, матеріали та реактиви

4.1. Обладнання та матеріали

Зона 1. Для підготовки зразків досліджуваного матеріалу:

- високошвидкісна центрифуга (13 тис. або більше об/хв.) з охолодженням;
- шафа біологічної безпеки 2 клас (наприклад, ESCO);
- вортекс-центрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2 мл;
- холодильник побутовий з холодильною камерою (+2 – +8 °С) та морозильною камерою (-16 – -20 °С);
- гомогенізатор;
- ваги лабораторні (наприклад електронні AXIS A500);
- опромінювач бактерицидний (наприклад ОБН-150М);
- окремий набір дозаторів піпеткових з регульованим об'ємом дози (наприклад Eppendorf Research plus);
- одноразові наконечники об'ємом 100 мкл і 1000 мкл з аерозольним бар'єром (наприклад Axygen, Eppendorf або Labcon);
- одноразові пробірки об'ємом 1,5 $см^3$ (наприклад Eppendorf);
- штативи для мікропробірок та наконечників (наприклад Axygen);
- окремий халат та одноразові гумові рукавички;
- контейнер для збору та інактивації патологічного матеріалу;
- контейнер для збору використаних наконечників;
- серветки безворсові;
- дезінфекційні розчини (70,0 % етиловий спирт, 10,0 % розчин хлорного вапна, 5,0 % розчин хлораміну або 0,5 % розчин віросану).

Зона 2. Для екстракції ДНК/ДНК з досліджуваного матеріалу:

- ламінарний бокс 2-го класу біологічної безпеки (наприклад, ESCO);
- твердотільний термостат-струшувач (із змінною температурою та частотою струшування) для пробірок об'ємом 1,5–2 мл, температурний діапазон 25–99 °С;
- високошвидкісна центрифуга (13 тис. або більше об/хв.) з охолодженням для пробірок об'ємом 1,5–2 мл,
- вортекс-центрифуга (наприклад, FVL – 2400N);
- опромінювач бактерицидний (наприклад ОБН – 150М);
- холодильник побутовий з холодильною камерою (+2 – +8 °С) та морозильною камерою (-16 – -20 °С);

- окремий набір дозаторів піпеткових з регульованим об'ємом дози (наприклад, Eppendorf Research plus);

- одноразові наконечники об’ємом 100 і 1000 мкл з аерозольним бар’єром (наприклад, Axygen, Eppendorf або Labcon);

- одноразові пробірки об’ємом 1,5 $см^3$ (наприклад, Eppendorf);

- штативи для мікропробірок та наконечників (наприклад, Axygen);

- окремий халат та одноразові гумові рукавички;

- контейнер для збору та інактивації патологічного матеріалу;

- контейнер для збору використаних наконечників;

- серветки безворсові;

- дезінфекційні розчини для обробки використаних матеріалів (10,0 % розчин хлорного вапна, 5,0 % розчин хлораміну або 0,5 % розчин віросану) та обробки робочого місця (засіб для видалення ДНК/ДНК Ultra Clean Lab Cleaner або аналогічний).

Зона 3. Для проведення ампліфікації ДНК/ДНК:

- прилад для проведення ПЛР-РЧ (ампліфікатор), наприклад, «Rotor-Gene 6000» виробництва «QIAGEN Hilden» (Німеччина) або аналогічний;

- комп’ютер з програмним забезпеченням до ампліфікатора;

- джерело безперебійного живлення (наприклад, BNT-1000AP);

- ПЛР-бокс (наприклад, ESCO);

- окремий набір дозаторів піпеткових з регульованим об'ємом дози (0,5–10 мкл; 2–20 мкл, 10–100 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл) (наприклад Eppendorf Research plus);

- одноразові наконечники для дозаторів піпеткових з регульованим об'ємом дози з аерозольним бар’єром.

- одноразові пробірки для ПЛР об’ємом 0,2 та 0,5 $см^3$ (наприклад, Axygen);

- штативи для наконечників (наприклад, Axygen) і мікропробірок;

- окремий халат і одноразові рукавички;

- контейнер для збору використаних наконечників;

- дезінфекційні розчини для обробки використаних матеріалів (10,0 % розчин хлорного вапна, 5,0 % розчин хлораміну, 0,5 % розчин віросану тощо) та обробки робочого місця (засіб для видалення ДНК/ДНК Ultra Clean Lab Cleaner або аналогічний).

4.2. Реактиви

Для виділення ДНК використовують доступні в лабораторії комерційні набори (комплекти) для виділення ДНК/ДНК, наприклад, IndiSpin Pathogen Kit, INDICAL Bioscience; RNeasy Mini Kit, Qiagen; «PowerLyzer® UltraClean® Tissue RNA Isolation Kit», MoBio; Patho Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit, iNtRON Biotechnology або інші комерційні набори призначені для виділення нуклеїнових кислот із зразків різного генезу.

Контрольні зразки:

1) позитивний контрольний зразок;

2) негативний контрольний зразок.

Для дослідження використовуються праймери, нуклеотидні послідовності наведено в таблиці 1.

Таблиця1

Список праймерів для проведення ПЛР

Назва праймера	**Послідовність праймера (5`→3`)**	**Регіон гену**	**Специфічність**
CLOX1	CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT	CAL ген	*F. oxysporum*
CLOX2	CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT		
CLPRO1	TGCATCAGACCACTCAAATCCT		*F.proliferatum*
CLPRO2	GCGAGACCGCCACTAGAT		
Fspo-R	CAGCGCACCCCTCAGAGC		*F. sporotrichioides*
Fsp-F	CGCACGTATAGATGGACAAG		
Fgr-F	GTTGATGGGTAAAAGTGTG		*F. graminearum*
Fgr-R	CTCTCATATACCCTCCG		
VER1	CTTCCTGCGATGTTTCTCC		*F. verticillioides*
VER2	AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA		
C51F	ATGGTGAACTCGTCGTGGC		*F. culmorum*
C51R	CCCTTCTTACGCCAATCTCG		
FU_gen_f	CGGTTCAAGCATCCGATCTGC	TEF ген	*Fusarium визначення до роду*
FU_gen_r	CCTGACTTGATCTCACGC		

Для дизайну праймерів використовували послідовності ля дизайну праймерів використовували послідовності GeneBank наступних генів ITS-регіону (Internal Transcribed Spacer): висококонсервативною ділянкою в межах одного роду, але варіює між різними родами, що робить її ідеальною для ідентифікації різних видів грибів. Для дизайну праймерів використано CAL та TEF гени цього регіону, які є консервативними та можуть використовуватись для філогенетичних досліджень та ідентифікації видів *Fusarium*.

CAL (calmodulin), OL771368.1, OL771367.1, LC685183.1, LC685181.1,

TEF (translation elongation factor 1-alpha), Fusarium graminearum translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, GenBank: KM373923.1, PP449342.1, PP449339.1,

5. Етапи ПЛР

5.1. Екстракція ДНК з досліджуваного матеріалу

Для виділення ДНК зі зразків патологічного та/або біологічного матеріалу використовують комерційно доступні набори, які передбачають виділення ДНК згідно інструкції виробника.

Метою даного етапу є виділення ДНК з клітин та очищенні її від білків, жирів, вуглеводів та дезактивації клітинних ферментів. Процес виділення ДНК складається з наступних етапів:

- лізування (під час даного етапу відбувається руйнування мембран клітин і ядер, вихід ДНК в розчин, звільнення її від білків та дезактивація клітинних ферментів);

- адсорбція ДНК (зв'язування ДНК з адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок, на поверхні магнітних частинок (в залежності від набору, який використовується для виділення НК));

- відмивання (ДНК від білків, жирів, вуглеводів і залишків клітинних мембран);

- елюція (відокремлення ДНК від адсорбуючої речовини і перехід ДНК в розчин).

Під час виділення ДНК обов'язковим є використання негативного контролю виділення (НКВ) (використовується для виявлення контамінації досліджуваних зразків між собою), що являє собою деіонізовану воду вільну від ДНКаз та ДНКаз.

Враховуючи молекулярну нестабільність ДНК, з нею необхідно поводитись обережно. Виділену ДНК зберігають при температурі від 2 до 8 °С до 4 годин, при температурі не вище -16 °С до трьох місяців, за температури не вище мінус 68 °С до року.

Слід мінімізувати кількість циклів замороження-розмороження.

5.2. Підготовка реакційної суміші та проведення ампліфікації

Для проведення досліджень використовується 7 пробірок для кожного зразка - по одній для кожної пари праймерів.

Підрахувати необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготувати для них пробірки.

Розморозити всі компоненти набору, змішати шляхом вортексування і центрифугувати протягом 5 с для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

Приготувати реакційну суміш (на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші) згідно таблиці 2.

Таблиця 2

Склад та кількість компонентів з розрахунку на 1 реакцію

Компонент	**Кількість на одну реакцію, мкл**
Буфер для ПЛР (10Х)	2,5
Taq полімераза	0,2 (1,25 Одиниць)
$MgCl_2$ 2,0 мМ	1,0
dNTPs (0,25 мМ суміші)	1,5
Прямий праймер (0,5 мкМ)	1,0
Зворотний праймер (0,5 мкМ)	1,0
Виділена ДНК	5,0
Дистильована вода для молекулярно-генетичних досліджень	До 25,0
Загальний об'єм	**25,0**

Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати протягом 2 с для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 20 мкл реакційної суміші.

Внести по 5 мкл ДНК дослідних зразків у відповідні пробірки.

Внести 5 мкл ДNase-Free Water (негативний контроль) у відповідну пробірку.

Внести 5 мкл позитивного контролю у відповідну пробірку.

Помістити пробірки із зразками в ампліфікатор.

Запустити програмне забезпечення ампліфікатора і встановити наступні параметри ампліфікації:

Таблиця 3

Програма температурного режиму ампліфікатора для проведення ПЛР з метою виявлення мікроскопічних грибів роду Fusarium з використанням запропонованих наборів наборів праймерів

Етап	Режим	Кількість циклів
Активація полімерази	94 °С – 5 хв	1
Денатурація Відпал Елонгація	94 °С – 30°С	35
	58 °С – 30 с	
	72 °С – 30 с	
Фінальна елонгація	72 °С – 7 хв	1
Зберігання	10 °С	Зберігання

5.3. Облік та інтерпретація результатів ПЛР шляхом проведення електрофорезу в агарозному гелі

У мірний циліндр вносили вміст одного пакету із сухою сумішшю ТБЕ буфера та доводили дистильованою водою до об'єму 500 см3, закриваючи циліндр парафінованою плівкою ("PARAFILM") і перемішували.

Вміст одного пакету з агарозою переносили у термостійку колбу об'ємом

250 $см^3$, додаючи 10 $см^3$ концентрату ТБЕ – буфера з бромідом етидія та доводячи об'єм дистильованою водою до 100 $см^3$. Після чого суміш обережно перемішували, доводячи до кипіння та охолоджуючи до температури 62 ± 2°С. Заливали агарозний гель у форму (товщина гелю 5-6 мм), поміщали гребінки на відстані не менше 3 см одна від одної. Після повного загусання гелю (30 хв. за кімнатної температури) обережно виймали гребінки, не пошкоджуючи утворені лунки. Поміщали смугу готового гелю в електрофоретичну камеру так, щоб лунки були звернені убік негативного

електроду (ДНК із лунок буде рухатися до позитивного електроду) і наливали готоий ТБЕ буфер, щоб він вкрив гель на 4-5 мм.

Виставляли пробірки з продуктами ампліфікації в штатив послідовно.

Відбирали 0,01 см3 ПЛР продукту і вносили на дно лунки.

Підключали камеру до джерела струму, дотримуючись полярності. Електрофорез проводили у градієнті напруги 10 В/см2 до того моменту, як блакитний барвник (ксиленціанол) відійде приблизно на 1 см від лунок гелю.

Після того, як виключили джерело струму, переносили гель на транс-ілюмінатор, розташовуючи смуги горизонтально лунками нагору. Перегляда-ли розташування смуг ДНК під ультрафіолетовим випромінюванням.

Електрофореграму фотографували за допомогою цифрової фотокамери.

Відпрацьовані буфер і гель, що містять бромід етидія, дезактивували. Для цього до одного об'єму буфера і гелю додавали рівні об'єми 0,5М KMnO4 і 2,5М HCl, витримуючи 4-6 годин та додаючи один об'єм 2,5М NaOH, обережно перемішували.

Облік результатів ПЛР на присутність цільових ділянок геному в досліджуваних зразках починали з результатів ампліфікації позитивного та негативних контролів. У доріжці позитивного контролю (ВПГ-А) спостерігались смужки оранжевого кольору, що світяться та відповідають фрагментам ДНК розрахованого розміру. Позитивні дослідні зразки мали аналогічну смужку більшої або меншої інтенсивності на тому ж рівні, що і смужка в «позитивному» контролі. «Негативний» контроль, як і негативні досліджувані зразки не мали жодних смужок.

Далі враховували результати ампліфікації ДНК досліджуваних зразків. Результат вважали позитивним на присутність грибів роду Fusarium, якщо суворо навпроти позитивного контрольного зразка (ПКЗ) у доріжці відповідної проби присутні специфічні смуги на тому ж рівні. Результат вважали негативним, якщо в досліджуваних зразках відсутні будь-які смуги навпроти ПКЗ, але у доріжках можуть спостерігатися нечіткі розмиті смуги димерів праймерів, що розташовуються нижче рівня 100 п.н.з. (у нижній частині доріжки). Варто провести повторну ПЛР, якщо специфічна смуга дуже низької інтенсивності (набагато нижче інтенсивності позитивного контролю). Якщо такий результат повторювався, то його вважали сумнівним. Для уточнення результату необхідно було проводити повторне дослідження. Інтенсивність світіння смуги залежить від кількості нуклеїнової кислоти у пробі, що досліджується.

Вигляд електрофореграми результатів ампліфікації представлено на рис.1

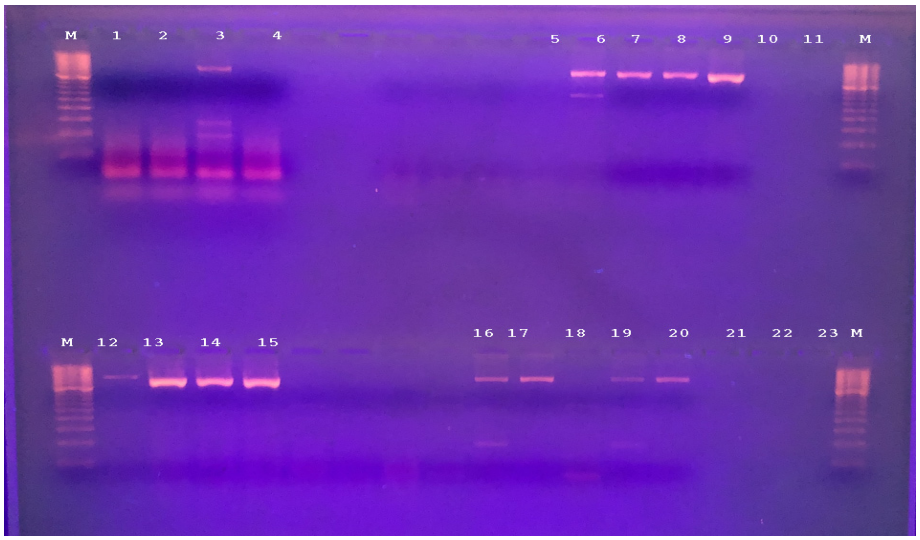

Рис.1 електорофореграма продуктів ампліфікації окремих видів мікроскопічних грибів роду *Fuzarium:M- маркер молекулярної ваги, 1-4 негативні контролі (Alternaria spp, Aspergillus spp, Penicillium spp, Trichoderma spp); праймери Fgr-F Fgr-R 5 – 9 - F. graminearum, 10 -11 – суміш ДНК Fuzarium інших досліджених видів; праймери CLOX1 CLOX2 12- 15 - F.oxysporum; праймери FUgen_f та FUgen_r 16, 17, 19,20 – виявлено мікроскопічні гриби роду Fuzarium, 18-23 – негативний результат.*

6. Заходи безпеки при постановці ПЛР

Для роботи з ДНК/ДНК використовують тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, що мають спеціальне маркування «RNase-free» або «DNase-free». Працюють тільки в одноразових рукавичках. Всі маніпуляції, пов'язані з підготовкою проб, проводяться дозаторами змінних об’ємів із використанням одноразових поліпропіленових пробірок і наконечників з аерозольним бар’єром. Використаний одноразовий пластиковий посуд (пробірки, наконечники) слід складати у спеціальний контейнер, що містить один із розчинів: 10 % розчин хлорного вапна, 5 % розчин хлораміну Б або 0,5 % розчин віросану. Після тригодинної витримки розчин виливають у каналізацію, а відпрацьований пластик автоклавують за тиску в 1 атмосферу протягом 30 хв і переміщують в контейнер для сміття.

Лабораторне устаткування (дозатори, лабораторний посуд тощо, а також робочі розчини) повинні бути суворо стаціонарними. **ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ** їхнє переміщення з однієї кімнати в іншу.

Рекомендується опромінювати приміщення ультрафіолетовим світлом упродовж 1 години до початку та після закінчення робіт.

7. Способи знешкодження та утилізації біологічного та/або патологічного матеріалу

З біологічним матеріалом завжди треба поводитись, як із потенційно небезпечним. Використані матеріали і відходи перед утилізацією слід знезаражувати за допомогою сильного окиснювача. Невикористані флакони з позитивними, негативними та досліджуваними матеріалами перед утилізацією інактивують автоклавуванням за температури +130 °С та тиску 2 кг/см^3 протягом 45 хв. Всі тверді відходи після проведення ПЛРслід збирати в спеціальний контейнер і автоклавувати протягом 1 години за температури +120 °С.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Моніторингові дослідження мікобіоти кормів з різних регіонів України / О.М. Васянович, О.Ф. Корзуненко, А.Ф. Ображей та ін. // Ветеринарна біотехнологія. – 2003. – №4. – С. 27–30.

2. Андрійчук А. В. Токсигенні властивості мікроміцетів зерна пшениці та ячменю / А. В. Андрійчук, А. В. Білан, П. І. Сидорчук // Вісник аграрної науки.– 2011. – № 9. – С. 22–24.

3. Дворская Ю. Микотоксины в кормах: влияние на животных / Ю. Дворская // Ефективні корми та годівля. – 2016. – № 2. – С. 34–38.

4. Контамінація зерна кукурудзи фузаріотоксинами Т-2, F-2 та ДОН / В. В. Рухляда, А. В. Андрійчук, О. А. Розпутня [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 8. – С. 31–34.

5.Труфанов О. В. Мониторинг загрязненности микотоксинами зерна и кормов в Украине в 2005-2010 гг. / О. В. Труфанов // Сучасні проблеми токсикології. – 2011. – № 1-2. – С.55-59

6. Ji, F. Occurrence, toxicity, production and detection of Fusarium mycotoxin: a review/ Ji, F., He, D., Olaniran, A.O. [et al.] //. Food Prod Process and Nutr.– 2019.– № 1, 6, https://doi.org/10.1186/s43014-019-0007-2.

7. Ahangarkani, F., A review on incidence and toxicity of fumonisins / Ahangarkani, F., Rouhi, S., & Azizi, I. G. //Toxin Reviews.–2014.–33, 6. https://doi.org/10.3109/15569543.2013.871563

8. Апатенко В. Небезпечні мікотоксини / В. Апатенко // Агробізнес сьогодні. – 2011. – № 1/2. – С. 18–20.

9. Chauhan, R., Recent advances in mycotoxins detection./ Chauhan, R., Singh, J., Sachdev, T., Basu, T., & Malhotra, B. D. // Biosensors & Bioelectronics.–2016.– 81, –P. 532–545.

https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.004

10. Chen, Y. Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut/ Chen, Y., Chen, Q., Han, [et al.] // Food Chemistry.–2016.– 213,– P. 478–484. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.116.

11. Feng, Y. Z., Natural occurrence of fumonisins b1 and b2 in corn from three main production provinces in China./ Feng, Y. Z., Lu, X. H., Tao, B. [et al.] // Journal of Food Protection.– 2011.– 74, 5. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-103.

12. Rahmani A. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins / A. Rahmani, S. Jinap, F. Soleimany // Food Science And Food Safety. – 2009. – Vol. 8. – P. 202–252.

13. Marin, S., Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food and Chemical Toxicology / Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. // International journal published for the British Industrial Biological Research Association.,– 2013.– 60,–P. 218–237. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047.

14. Yli-Mattila T., Real-time PCR detection and quantification of Fusarium poae, F. graminearum, F. sporotrichioides and F. langsethiae in cereal grains in Finland and Russia / T.Yli-Mattila, S. Paavanen-Huhtala, M.Jestoi, [et al.] // Arch. Phytopathol. Plant Prot. – 2008.– – № 41.– P. 243–260.

15. Міждержавний стандарт. Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Метод визначення токсичності ДСТУ 3570-97 /ГОСТ 13496. 7-97. – Затв. 28. 02. 98 р. № 125. Введений в дію 01. 07. 1999 р.

16. Васянович О. М., Руда М. Є., Сапейко В. П., Янголь Ю. А., Брезвин О. М. Вивчення біосинтезу грибів роду Fusarium moniliforme sheldon здатних продукувати мікотоксини-фумонізини. Ветеринарна біотехнологія. 2018. Вип. 32(2). С. 60–67.

17. Васянович О. М., Ображей А.Ф. Вивчення розповсюдження грибів роду Fusarium на кормах. Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія». 2003. № 3. С. 14–19.

18. Grenier B., Oswald I. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. World Mycotoxin Journal. 2011. № 4 (3). C. 285–313.

19. Harvey B., Edrington T. S., Kubena L. F., Rottinghaus G. E., Turk J. R., Genovese K. J., Ziprin R. L., Nisbet D. J. Toxicity of fumonisin from *Fusarium verticillioides* culture material and moniliformin from *Fusarium fujikuroi* culture material when fed singly and in combination to growing barrows. J. Food Prot. 2002. № 65. P. 373–377.

20. Mycotoxins: Risks in plant, animal, human systems. Task Force Report. Ames, Iowa : Council for Agricultural Science & Technology. 2003. № 139. 199 p. ISBN 1-887383-22-0.

21. Rahmani A., Jinap S., Soleimany F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. Food Science And Food Safety. 2009. Vol. 8. P. 202–252.

22. Ross P. F., Rice L. G., Osweiler G. D., Nelson P. E., Richard J. L., Wilson T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. Mycopathologia. 1992. № 117. P. 109–114.

23. Ruff M. D., Huff W. E., Chute M. B. Characterization of the toxicity of the mycotoxins aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin in game birds. II. Ringneck pheasant. Avian. Dis. 1992. № 36. P. 30–33.

24. Willsey, T. L., Chatterton, S., Heynen, M. and Erickson, A. 2018. Detection of interactions between the pea root rot pathogens Aphanomyces euteiches and Fusarium spp. using a multiplex qPCR assay. Plant Pathol. 67:1912-1923.

25. Zhu, Z. X., Zheng, L., Hsiang, T., Yang, G. L., Zhao, D. L., Lv, B., Chen, Y. F. and Huang, J. B. 2016. Detection and quantification of Fusarium commune in host tissue and infested soil using real-time PCR. Plant Pathol. 65:218-226.

26. Піщанський О.В., Гаркавенко Т.О., Меженський А.О. та ін. (2019). Методичні рекомендації з організації та відбору проб для діагностичних досліджень на заразні хвороби тварин та птиці. Київ: ДНДІЛДВСЕ. 123 с.

КУЦАН Олександр Тихонович
доктор ветеринарних наук, старший науковий завідувач сектором мікотоксикології ІВМ НААН
ТАРАСОВ Олександр Анатолійович
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторією зоонозних інфекцій та оцінки ризиків ІВМ НААН
КРИЦЯ Яна Петрівна
кандидат ветеринарних наук, доцент, завідувач лабораторією «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН
ЗАХАРОВА Ольга Михайлівна
кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН
ЯНГОЛЬ ЮЛІЯ АНАТОЛІЇВНА
Вчений секретар ІВМ НААН
СИДОРЕНКО Тетяна Володимирівна
головний фахівець лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ДІАГНОСТИКА ФУЗАРІОЗІВ ЗЕРНА МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР)

В авторській редакції

Підписано до друку 09.09.25 Формат 60х84\16
Ум. друк. арк. 1,3
Наклад 100 прим. Зам. № 250574

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041
тел.: 527-81-55