

УДК 619:637.5.012:579.62

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МЯСА, ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ И ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А. В. Тюнев¹, М. В. Алексеева²¹ Научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, e-mail: atunes6f@mail.ru² Ветеринарный врач, ФГБУ «ЦНМВЛ», г. Москва, e-mail: allamarya@mail.ru

РЕЗЮМЕ

В современной лабораторной практике широко применяются экспресс-методы исследований, позволяющие проводить анализ сырья и продуктов животного происхождения гораздо быстрее, чем при использовании классических методов. Проведена оценка различных экспресс-методов диагностики и идентификации бактерий рода *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, БГКП, КМАФАнМ. В работе использованы методы флуоресцентного, энзимсвязанного иммунофлуоресцентного (ELFA), а также иммунохроматографического анализа. Для количественного определения КМАФАнМ и БГКП использовали прибор TEMPO® BioMérieux, для диагностики бактерий рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* – VIDAS и miniVIDAS, а также иммунохроматографические тест-системы Singlepath. Установлено, что все применяемые экспресс-методы отличаются высокой точностью и специфичностью, позволяют сократить время проведения исследования, а результаты подтверждаются общепринятыми классическими методами микробиологических исследований. Среди проанализированных образцов мяса КРС количество подтвержденных положительных результатов составило 100 (10,8% от общего количества проведенных исследований). Экспресс-методом получено 53 положительных результата (подтверждены классическим методом), что составляет 20,37% от общего количества проведенных исследований. С применением классических методов диагностики при исследовании внутренних органов КРС получено 56 положительных результатов (12,6%). Экспресс-методом положительные результаты получены в 13 случаях (13%). Используемые в работе экспресс-методы позволяют экономить время, отличаются высокой точностью и специфичностью результатов, прослеживаемостью измерений, простотой использования и обслуживания приборов, продолжительностью сроков хранения реактивов.

Ключевые слова: флуоресцентный метод, энзимсвязанный иммунофлуоресцентный анализ, иммунохроматографический метод, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, БГКП, КМАФАнМ, говядина, мясо, внутренние органы.

UDC 619:637.5.012:579.62

USE OF RAPID METHODS FOR TESTING MEAT, VISCERA AND ANIMAL PRODUCTS

A. V. Tyunev¹, M. V. Alekseyeva²¹ Researcher, FGBI "VGNKI", Moscow, e-mail: atunes6f@mail.ru² Veterinarian, FGBI "CSMVL", Moscow, e-mail: allamarya@mail.ru

SUMMARY

Rapid methods of testing are widely used in current laboratory practice. They enable to perform the analysis of animal raw materials and animal products much faster in comparison with classical methods. Different methods of rapid diagnosis were evaluated, and identification of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, coliforms, QMAFAнM was performed. The following methods of analysis were used: fluorescent analysis, enzyme linked fluorescent assay (ELFA), and immunochromatographic assay. TEMPO® BioMérieux system was used for quantitative determination of QMAFAнM and coliforms; VIDAS and miniVIDAS instruments were used for the diagnosis of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*; immunochromatographic test-systems Singlepath were also used. All the used rapid methods have demonstrated high accuracy and specificity, they allow to shorten test time, and their results were confirmed by classical microbiological tests. 100 positive confirmed results were obtained from testing beef samples (10.8% of the total number of tests performed). 53 positive results were obtained in rapid test (confirmed by classical test), which makes 20.37% of the total number of tests performed. 56 positive confirmed results were obtained from testing cattle viscera using classical tests (12.6%). 13 samples tested positive using rapid test (13%). The used rapid tests are timesaving, demonstrate high accuracy and specificity, enable to trace measurements; tools are easy to use and maintain, and reagents have a long shelf life.

Key words: fluorescent assay, enzyme linked fluorescent assay, immunochromatographic test, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, coliforms, QMAFAнM, beef, meat, viscera.

ВВЕДЕНИЕ

Экспресс-методы исследований в современной лабораторной практике имеют огромное значение благодаря возможности быстрого проведения анализа. Так, например, при использовании экспресс-анализатора ТЕМПО® подготовку 24 образцов, исследуемых по трем показателям (КМАФАнМ, БГКП, *S. aureus*), при задействовании одного специалиста можно провести за 130 минут. Три специалиста, проводя те же исследования классическими методами, по тем же показателям, тратят на ту же задачу до 830 минут (с учетом подготовки питательных сред). Особенно много времени требуется на процесс последовательных разведений и приготовления перед считыванием результатов и выделение единичных колоний.

Все применяемые экспресс-методы (флуоресцентный, энзимсвязанный иммунофлуоресцентный, иммунохроматографический) широко используются в пищевом производстве и ветеринарной лабораторной практике для быстрого проведения микробиологических исследований на наличие в сырье и продуктах животного происхождения различных групп микроорганизмов, таких как БГКП, КМАФАнМ, *S. aureus*, бактерий рода *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, которые могут приводить не только к порче продуктов, но и к пищевым инфекциям, токсикозам человека и животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась в отделе ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБУ «ЦНМВЛ» (г. Москва). Микробиологическому контролю подвергли 270 проб мяса КРС, в том числе 60 проб исследовали с применением как классических, так и экспресс-методов диагностики, с последующим подтверждением классическими методами. Из 111 проб внутренних органов КРС (печень – 69, сердце – 36, кишечное сырье – 6) 25 проб исследовали с применением экспресс-методов.

При проведении исследований применяли методы флуоресцентного, энзимсвязанного иммунофлуоресцентного (ELFA), а также иммунохроматографического анализа. Для количественного определения КМАФАнМ и БГКП использовали прибор ТЕМПО® BioMérieux, для диагностики бактерий рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* – приборы VIDAS и miniVIDAS, а также иммунохроматографические тест-системы Singlepath.

Образцы мяса и внутренних органов исследовали в соответствии со следующими стандартами: ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002); ГОСТ 10444.15-94; ГОСТ 32031-2012; ГОСТ 31747-2012; ГОСТ 31746-2012; МР 02.031-08; МР 11-3/278-09.

Пробоподготовку осуществляли согласно ГОСТ Р ИСО 6887-2-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила подготовки мяса и мясных продуктов».

При проведении исходного разведения 10 г материала вносили в 90 мл стерильного физиологического раствора. 1 см³ взвеси (гомогената) содержит 0,1 г исследуемого образца.

Исследование на КМАФАнМ. Готовили ряд десятикратных разведений подготовленного гомогената по ГОСТ 26669-85. Затем вносили по 1 мл полученного разведения в чашку Петри, заливали по ГОСТ 26670-91 мясопептонным агаром, предварительно растопленным на водяной бане, и инкубировали при температу-

ре 30 °С в течение 48–72 ч в аэробных условиях. Учет результатов проводили через 24, 36, 48, 60 и 72 ч. Для подсчета количества колоний отбирали чашки Петри, на которых выросло от 15 до 300 колоний, использовали автоматический счетчик колоний aCOlyte [2].

Подсчет КМАФАнМ. Использовали тестовый набор ТЕМПО TVC. Во флакон вносили 3,9 см³ стерильного физиологического раствора и 0,1 см³ суспензии, гомогенизировали в течение 3 с. Для приготовления первичной навески можно также использовать специальные двухсекционные пакеты ТЕМПО с фильтром, откуда отбирают профильтрованную суспензию.

Исследование на БГКП. После проведения ряда последовательных разведений, в зависимости от типа исследуемого образца, вносили в пробирку с селективной обогатительной средой (бульон Кесслера) 1 мл полученного разведения, помещали в термостат и инкубировали при температуре 37 °С 24 или 48 ч. Пробы с образованием газа и помутнением среды считали положительными и пересев на жидкую подтверждающую среду не проводили, а производили посев бактериологической петлей на агаризованную дифференциально-диагностическую среду Эндо, инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 ч, затем проводили просмотр посевов и отмечали рост типичных и атипичных бактерий [4].

Подсчет количества БГКП. Использовали тестовый набор ТЕМПО ТС. Для этого готовили необходимое количество флаконов со средой ТС из расчета один флакон на один образец. Флаконы выдерживали до достижения комнатной температуры и вносили по 3,0 см³ стерильного физиологического раствора и по 1 см³ суспензии [6]. Далее – аналогично процедуре подсчета КМАФАнМ.

Исследование на наличие бактерий рода Salmonella. Навеску массой 25 г вносили в забуференную пептонную воду объемом 225 мл и инкубировали при температуре 37 °С в течение (18 ± 2) ч. Затем 1,0 см³ культуры вносили в (10,0 ± 0,1) см³ среды Раппапорта – Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) и инкубировали при температуре 41,5 °С в течение (24 ± 3) ч; 1,0 см³ вносили в тетратионатный бульон Мюллера – Кауфмана (МКТ-бульон) и инкубировали при температуре 37 °С в течение (24 ± 3) ч. Далее определяли бактерии рода *Salmonella* экспресс-методом на анализаторе VIDAS с набором VIDAS SLM. Для этого 500 мкл культуры переносили в стрип и помещали в прибор вместе с наконечниками, на внутреннюю поверхность которых нанесены антитела [5]. Для проведения иммунохроматографического анализа с применением тест-системы Singlepath 2 мл культуральной жидкости (RVS-бульон) переносили в стеклянную пробирку, инактивировали на кипящей водяной бане 15 мин, охлаждали до комнатной температуры и вносили по 160 мкл в лунку для образца. Полученные на RVS- и МКТ-бульоне культуры пересевали на две селективные агаризованные среды – ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) и Rambach-агар – и инкубировали при температуре 37 °С в течение (24 ± 3) ч. При отсутствии типичных или не совсем типичных (подозрительных) колоний работу с посевами прекращали и конечный результат определяли как отсутствие бактерий рода *Salmonella* в анализируемой навеске (массе, объеме) продукта. Колонии, предположительно относящиеся к бактериям рода *Salmonella*, идентифицировали с помощью биохимических и серологических тестов [1].

Исследование на наличие *Listeria monocytogenes*. Для приготовления образцов брали навеску 25 г и переносили в 225 мл бульона Фрайзера I (полуконцентрированный), гомогенизировали и инкубировали при температуре 30 °С в течение 24 ч. Затем 0,1 см³ культуральной жидкости вносили в (10,0 ± 0,1) см³ бульона Фрайзера II (с полной концентрацией селективных компонентов) и инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. После этого этапа возможно проведение определения бактерий рода *Listeria* (в частности, *Listeria monocytogenes*) при помощи экспресс-метода на анализаторе VIDAS с набором VIDAS LMO II. Для этого 500 мкл культуры перенесли в стрип, нагрели на водяной бане при 95–100 °С, охладили (5–10 мин) и установили в прибор вместе с наконечниками, на внутреннюю поверхность которых нанесены антитела. Для проведения иммунохроматографического анализа с применением тест-системы Singlepath 150 мкл охлажденной культуральной жидкости из среды Фрайзера II вносили в лунку для образца. Из всех пробирок со средой Фрайзера II проводили пересев на две селективные агаризированные среды – ALOA- и Палкам-агар – и инкубировали при (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч. Для идентификации бактерий рода *Listeria* и штамма *Listeria monocytogenes* необходимо было получить чистые культуры, для чего характерные колонии (по 5 колоний) переносили на агар ALOA. Посевы проводили по методу Дригальского и инкубировали при (37 ± 1) °С в течение

(24 ± 3) ч до появления видимого роста. Затем проводили изучение их морфологических, культуральных и биохимических свойств [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С применением классических методов при исследовании образцов мяса КРС количество подтвержденных положительных результатов составило 100, это 10,8% от общего количества проведенных исследований (1080). Экспресс-методом было получено 53 положительных результата (подтверждены классическим методом), что при общем количестве проведенных исследований (240) составляет 20,37%.

С применением классических методов диагностики при исследовании внутренних органов КРС получено 56 положительных результатов, что при общем количестве проведенных исследований (444) составляет 12,6%. Экспресс-методом положительные результаты получены в 13 случаях, что при общем количестве проведенных исследований (100) составляет 13%.

Результаты выявления бактерий рода *Salmonella*. Время для проведения исследования 30 проб мяса КРС на приборе VIDAS составило 48 мин (30 проб за один запуск прибора с полной загрузкой), 60 проб – 96 мин. При проведении исследований образцов мяса КРС экспресс-методом (VIDAS) выявлены две положительные пробы (табл. 1) с бактериями рода *Salmonella*. Была проведена серотипизация и выделены следующие изоляты: *S. enteritidis*, *S. dublin*.

Время проведения исследования 24 проб внутренних органов КРС (табл. 2) на приборе VIDAS составило

Таблица 1
Результаты исследований мяса КРС

Показатель	КМАФАнМ				БГКП				<i>Salmonella</i>				<i>Listeria monocytogenes</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Мясо КРС (всего проб)	270	52	60	24	270	43	60	24	270	2	60	2	270	3	60	–
Мясо замороженное в тушах, полутушах, четвертинах, отрубях	35	4	4	4	35	6	4	4	35	–	4	–	35	–	4	–
Мясо охлажденное в тушах, полутушах, четвертинах, отрубях	66	14	21	14	66	13	21	6	66	1	21	1	66	–	21	1
Мясо охлажденное в отрубях (бескостное и на кости), упакованное под вакуумом или в модифицированную газовую атмосферу	8	10	–	5	8	5	–	5	8	–	–	–	8	1	–	–
Мясо замороженное убойных животных в тушах, полутушах, четвертинах, отрубях	101	6	28	1	101	–	28	–	101	–	28	–	101	–	28	1
Мясо замороженное убойных животных: блоки из мяса на кости, бескостного, жилованного	54	6	7	–	54	9	7	9	54	–	7	–	54	1	7	1
Вынужденный убой	6	12	–	–	6	10	–	–	6	1	–	1	6	1	–	–

1 – классический метод;
2 – в том числе положительные;
3 – экспресс-метод;
4 – в том числе положительные.

Таблица 2
Результаты исследований внутренних органов КРС

Показатель	КМАФАнМ				БГКП				<i>Salmonella</i>				<i>Listeria monocytogenes</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Внутренние органы КРС (всего проб)	111	28	25	8	111	20	25	10	111	4	25	4	111	4	25	4
Печень	69	20	14	4	69	1	10	6	69	2	14	2	69	2	14	2
Сердце	36	2	9	–	36	6	9	–	36	–	9	–	36	–	9	–
Кишечное сырье КРС	6	6	–	4	6	13	4	4	6	2	–	2	6	2	–	2

1 – классический метод;
2 – в том числе положительные;
3 – экспресс-метод;
4 – в том числе положительные.

48 мин (24 пробы за один запуск прибора с полной загрузкой). При проведении исследований образцов субпродуктов КРС экспресс-методом (VIDAS) было выявлено пять положительных проб с бактериями рода *Salmonella*. Реакцией серотипизации подтверждены следующие изоляты бактерий рода *Salmonella*: *S. dublin* – 3 шт.; *S. enteritidis* – 2 шт.; *S. infantis* – 1 шт.

Результаты выявления бактерий *Listeria monocytogenes*. При проведении исследований образцов мяса КРС экспресс-методом были выявлены три положительные пробы. Время проведения исследования 24 проб субпродуктов КРС на приборе VIDAS составило 70 мин (24 пробы за один запуск прибора с полной загрузкой). При проведении исследований субпродуктов КРС экспресс-методом диагностики VIDAS были выявлены четыре положительные пробы с бактериями рода *Listeria monocytogenes*.

Результаты выявления БГКП. При проведении исследований с применением классического и экспресс-метода на приборе TEMPO® BioMérieux для количественного определения БГКП в мясе КРС было получено 43 положительных результата, при исследовании субпродуктов – 20. При биохимическом исследовании выделенных изолятов оценивали результаты согласно цветовой таблице реакций. Сложив индексы положительных реакций, составили 7-значные коды, которые соответствуют: *E. coli* – в 19 образцах; *Citrobacter freundii* – в 23 образцах; *Klebsiella* spp. – в 31 образце.

Результаты исследования на КМАФАнМ. С применением классических методов и экспресс-метода на приборе TEMPO® BioMérieux при проведении исследований образцов мяса КРС было получено 52 положительных результата, а образцов внутренних органов КРС – 28 положительных результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении микробиологических исследований возможно применение различных экспресс-методов, которые позволяют сократить время исследования, обеспечивают высокую точность и достоверность, высокую степень автоматизации, повторяемость и прослеживаемость испытаний. Контроль положительных

результатов по-прежнему основывается на выделении чистой культуры из образца микробиологическим методом, что необходимо для получения достоверного результата.

Современные микробиологические экспресс-методы диагностики позволяют уменьшить издержки, добиться прозрачности и воспроизводимости на всех этапах исследования. Все полученные результаты были подтверждены классическими методами исследований. К недостаткам экспресс-методов можно отнести дорогостоящие расходные материалы, стандарты и техническое обслуживание, поэтому не все лаборатории могут приобрести необходимое оборудование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002). Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. – Введ. 01.07.13. – М.: Стандартинформ, 2014. – 25 с.
- ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. – Введ. 01.01.96. – М.: Стандартинформ, 2010. – 7 с.
- ГОСТ 32031-2012. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*. – Введ. 01.07.14. – М.: Стандартинформ, 2014. – 28 с.
- ГОСТ 31747-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). – Введ. 01.07.13. – М.: Стандартинформ, 2013. – 20 с.
- MP 11-3/278-09. Методы выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах с использованием анализатора Vidas/miniVidas производства фирмы «BioMérieux», Франция. Методические рекомендации: утв. заместителем Главного государственного санитарного врача РФ и Департаментом Госсанэпиднадзора Минздрава РФ 20 сентября 2001 г.
- MP 02.031-08. Сырье и продукты пищевые. Количественный микробиологический анализ пищевых продуктов НВЧ-методом при использовании автоматического анализатора TEMPO. Методические рекомендации: утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 30 июня 2008 г.