

# ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА

## УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КОНТРОЛЯ САЛЬМОНЕЛЛ В МЯСЕ И МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ И РОБОТОТЕХНИКИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МАТРИЧНОЙ ДНК

И.М. Нитяга<sup>1</sup>, Б.В. Уша<sup>1</sup>, Е.Н. Морозова<sup>2</sup>,  
Н.Г. Хоменец<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Московский государственный  
университет пищевых производств»  
*Волоколамское шоссе, 11, Москва, Россия, 125080*

<sup>2</sup>ФГБНУ «ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»  
*Звенигородское шоссе, 5, Москва, Россия, 123022*

<sup>3</sup>Агроинженерный департамент  
Российский университет дружбы народов  
*ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198*

Традиционно контроль сальмонелл в продуктах питания осуществляют с помощью классических методов бактериологического анализа, которые достаточно длительны и трудоемки. Авторами показана возможность ускорения, автоматизации анализа и получения достоверных результатов с помощью усовершенствованной методики контроля *S. typhimurium* в мясе кур и мясных полуфабрикатах (пельменях) с помощью ПЦР в режиме реального времени и робототехники для выделения матричной ДНК, а также за счет сокращения времени пробоподготовки образцов путем подрачивания бактерий в среде первичного накопления.

**Ключевые слова:** сальмонеллы, мясо, мясные продукты, ПЦР в режиме реального времени, робототехника.

**Введение.** Контроль сальмонелл в продуктах питания является одним из основных критериев микробиологической безопасности, что соответствует установленным требованиями российских и международных нормативных документов. В настоящее время в соответствии с Федеральными законами «О техническом регулировании», «О безопасности пищевой продукции», «О качестве и безопасности пищевых продуктов» установлены критерии и требования безопасности продукции, отраженные в Технических регламентах Таможенного Союза. В частности, критерии на мясо и продукцию его переработки представлены в Технических регламентах Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» и Тех-

ническом Регламенте Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции». В этих документах приведены критерии микробиологической безопасности, в том числе на наличие сальмонелл. Существующие методики определения сальмонелл на основе классического бактериологического анализа достаточно длительные и трудоемкие. Весьма перспективной для ускоренной индикации и идентификации бактерий, в том числе и патогенных штаммов, является методика ПЦР в режиме реального времени, которая позволяет в течение короткого времени проводить анализ [1; 2].

Современное оборудование позволяет автоматизировать методики определения бактерий, что во многом решает задачу с сокращением времени проведения анализа [3]. Несмотря на определенные успехи в использовании метода ПЦР для контроля микробиологической безопасности продукции [4—6], актуальным остается совершенствование методик в части пробоподготовки (обогащение материала путем подращивания и выделение матричных ДНК), а также валидация методик к конкретным объектам.

**Целью работы** являлось усовершенствование методики контроля сальмонелл в мясе и мясных продуктах с помощью ПЦР в режиме реального времени и робототехники для выделения матричной ДНК, а также за счет сокращения времени пробоподготовки образцов путем подращивания бактерий в среде первичного накопления.

**Экспериментальная часть.** Объектами исследования являлись мясо кур и мясные полуфабрикаты (пельмени), а также искусственно контаминированные *S. typhimurium* образцы указанных продуктов. Для подращивания сальмонелл использовалась пептонная вода. Разрушение клеток и выделение ДНК осуществляли с помощью роботизированной станции Qiagen EZ1 Advanced XL, использующую технологию магнитных частиц, ПЦР проводили на амплификаторе RotorGene® 6000 (Corbett Research) с применением тест-систем «Амплиценс®*Salmonella spp.*» (ФГУНУ ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Референсными методами идентификации нами были использованы: классический бактериологический анализ и методика с применением прибора miniVidas.

**Результаты и их обсуждение.** При проведении исследований суточная культура бактерий *S. typhimurium* перед подращиванием в пептонной воде и обсеменении нейтральных образцов титровалась с коэффициентом 10. Всего было подготовлено 4 разведения, где каждое последующее разведение содержало в 10 раз меньше микробных клеток, чем предыдущее. Так, если в первом разведении было 1000 микробных клеток, то в последнем единичные клетки. Для исследования методом ПЦР брали исходный материал (смесь раститрованных клеток) и 4 образца мяса кур, искусственно обсемененных *S. typhimurium* (25 грамм гомогенизировали с 225 граммами пептонной воды и добавлением клеток *S. typhimurium* соответственно 1, 10, 100 и 1000) и термостатировали при  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2, 4, 6, 8 и 18 часов. Далее смесь раститрованных клеток до момента исследования хранили при температуре минус  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Так же поступали с материалом, взятом через 2, 4, 6 и 8 часов из обсемененных образцов.

Интерпретацию результатов ПЦР проводили на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct), равного 38. Были получены следующие значения (табл. 1).

Таблица 1

**Интерпретация результатов ПЦР**

Концентрация клеток <i>S. typhimurium</i> и время обогащения	Номер цикла пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией
1000 клеток	31
1000 клеток ч/з 2 часа	30
1000 клеток ч/з 4 часа	28
1000 клеток ч/з 6 часов	22
1000 клеток ч/з 8 часов	18
1000 клеток ч/з 18 часов	14
100 клеток	32
100 клеток ч/з 2 часа	31
100 клеток ч/з 4 часа	27
100 клеток ч/з 6 часов	21
100 клеток ч/з 8 часов	17
100 клеток ч/з 18 часов	14
10 клеток	33
10 клеток ч/з 2 часа	32
10 клеток ч/з 4 часа	28
10 клеток ч/з 6 часов	22
10 клеток ч/з 8 часов	17
10 клеток ч/з 18 часов	14
1 клетка	35
1 клетка ч/з 2 часа	34
1 клетка ч/з 4 часа	29
1 клетка ч/з 6 часов	23
1 клетка ч/з 8 часов	18
1 клетка ч/з 18 часов	14

Аналогичные результаты были получены для образцов мяса кур, искусственно контаминированных.

Таким образом, методом ПЦР были обнаружены ДНК *S. typhimurium* во всех 4 разведениях, включая единичные клетки, без подращивания.

Однако в искусственно контаминированных образцах рост амплифицируемой ДНК достоверно наблюдался после 4 часов подращивания. Подтверждение результатов идентификации было получено бактериологическим методом при выращивании бактерий в течение нескольких суток, а так же на приборе miniVidas через 18 часов.

**Выводы.** Обогащение выделенных из объектов исследований бактерий в среде первичного накопления в течение 4 часов позволяло достоверно идентифицировать *S. typhimurium* методом ПЦР в режиме реального времени.

Использование робототехники также позволило сократить время анализа в 1,5—2 раза и автоматизировать процесс.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR: Realtime monitoring of DNA amplification reactions // *Biotechnology*. 1993. N 11. P. 1026—1030.
- [2] Collado M.C., Delgado S., Maldonado A., Rodriguez J.M. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR // *Letters in Applied Microbiology*. 2009. 48. P. 523—528.
- [3] Светличкин В.В. Тест-системы и технические средства ускоренного контроля безопасности и качества объектов ветеринарного надзора / В.В. Светличкин, А.Б. Кононенко, С.П. Ярков, А.А. Стрелков, М.В. Кондратьева, А.И. Панюшкин // *Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии: Сб. науч. тр. Москва: ВНИИ ВСГЭ, 2010. № 1. С. 26—33.*
- [4] Денисова Е.А. Дифференциальное определение вегетативных и L-форм бактерий в объектах ветеринарного надзора с использованием «сэндвич» мембран и ПЦР в режиме «реального времени» / Е.А. Денисова, В.В. Светличкин, И.Н. Матвеева // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2014. № 4. С. 53—54.
- [5] Слизень В.В., Гудкова Е.И., Скороход Г.А. Разработка метода пцр для экспресс-идентификации *Salmonella* spp. И среди них *Salmonella enteritidis* // *Сборник научных трудов «Инновации в медицине»*. Минск: БГМУ, 2012.
- [6] Real-Time PCR *Salmonella*; ID of microorganisms Crystal (<http://www.mibio.ru>). 2012.

## IMPROVING THE CONTROL OF SALMONELLA IN MEAT AND MEAT PRODUCTS BY PCR IN REAL TIME AND ROBOTICS FOR THE SEPARATION MATRIX OF DNA

I.M. Nityaga<sup>1</sup>, B.V. Ysha<sup>1</sup>, E.N. Morozova<sup>2</sup>,  
N.G. Khomenets<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Moscow state university of food production  
*Volokolamskoe shosse, 11, Moscow, Russia, 125080*

<sup>2</sup>All-Russian scientific research institute of veterinary sanitation  
*Zvenigorodskoe shosse, 5, Moscow, Russia, 123022*

<sup>3</sup>Agrarian and technology institute  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, Russia, 117198*

Traditionally, the control of *Salmonella* in food products is carried out using classic methods of bacteriological analysis that are sufficiently long and labor-intensive. The authors have demonstrated the possibility of accelerating and automating the analysis and obtain reliable results by using an improved method for control of *S. typhimurium* in chicken meat and meat of semi-finished products (dumplings) by PCR in real time and robotics for the selection of the template DNA, as well as reducing the time of the sample preparation by growing bacteria in the environment of pre-enrichment medium.

**Key words:** *Salmonella*, meat, meat products, PCR, real-time, robotics.

## REFERENCES

- [1] Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR: Realtime monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993. N 11. P. 1026—1030.
- [2] Collado M.C., Delgado S., Maldonado A., Rodriguez J.M. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 2009. 48. P. 523—528.
- [3] Svetlicky V. Test systems and technical means of the accelerated control of safety and quality of objects of veterinary supervision / V. Svetlichny, A.B. Kononenko, S.P. Yarkov, A.A. Strelkov, M.V. Kondratieva, A.I. Panyushkin. *Problems of veterinary sanitation, hygiene and ecology: Proc. scientific. Tr.* Moscow: Institute of WSGA, 2010. No. 1. S. 26—33.
- [4] Denisova E.A., Svetlichny V.V., Matveeva I.N. The Differential definition of vegetative and L-forms of bacteria in the objects of veterinary supervision using the “sandwich” membranes and PCR in “real time”. *Bulletin of the Russian Academy of agricultural Sciences*. 2014. No. 4. P. 53—54.
- [5] Slug V.V., Gudkova E.I., Skorokhod G.A. Development of PCR for the rapid identification *Salmonella* spp. and among them *Salmonella enteritidis*. “*Innovations in medicine*”. Minsk, BSMU, 2012.
- [6] Real-Time PCR *Salmonella*; ID of microorganisms Crystal (<http://www.mibio.ru>). 2012.