
ТЕХНОЛОГИЯ И УПРАВЛЕНИЕ КАЧЕСТВОМ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

УДК 579 + 637.07

А.Л. Блинова, Д.В. Макаренко

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЕЕ СООТВЕТСТВИЯ ТРЕБОВАНИЯМ ТЕХНИЧЕСКИХ РЕГЛАМЕНТОВ

Определен микробиологический показатель безопасности молока, вызывающий ряд серьезных заболеваний у человека. Описан стандартизованный метод выявления бактерий рода Salmonella. Проведено исследование экспресс-методов для определения микробиологических показателей, которые целесообразно использовать при проведении государственного контроля (надзора) за соблюдением требований технических регламентов.

Ключевые слова: экспресс-метод, молочная продукция, государственный контроль (надзор), микробиологический показатель, технический регламент.

A.L. Blinova, D.V. Makarenko

APPLICATION OF EXPRESS METHODS OF MICROBIOLOGICAL TESTS OF DAIRY PRODUCTS TO ASSESS THE CONFORMITY OF TECHNICAL REGULATIONS

The article defines the microbiological indicator of milk safety, which causes a number of serious diseases in humans. A standardized method for the detection of Salmonella bacteria is described. Research of Express methods for determination of microbiological indicators which it is expedient to use at carrying out the state control (supervision) over observance of requirements of technical regulations is carried out.

Key words: express-method, dairy products, state control (supervision), microbiological index, technical regulations.

Большая роль при государственном контроле (надзоре) за соблюдением требований технических регламентов на пищевую продукцию как одной из форм оценки ее соответствия принадлежит метрологическому обеспечению испытаний, так как получение достоверной информации о соответствии значений показателей безопасности продукции требованиям нормативной документации во многом зависит от применяемых средств и методов испытаний, в том числе методик выполнения измерений [1].

Так как молочная продукция является часто употребляемой, а также, учитывая ее роль в питании детей, необходимо соблюдать обязательные требования, установленные в Техническом регламенте Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» (далее ТР ТС 033/2013) и других технических регламентах Таможенного союза (далее ТР ТС), действие которых на нее распространяется во избежание причинения вреда жизни и здоровью населения [2, 3].

Уровни содержания в молочной продукции, предназначенной для выпуска в обращение на таможенной территории Таможенного союза, токсичных элементов, потенциально опасных веществ, микотоксинов, антибиотиков, пестицидов, радионуклидов, микроорганизмов не должны превышать допустимых уровней [4].

При проведении государственного контроля (надзора) за соблюдением обязательных требований, установленных к молочной продукции, наиболее проблематичными являются

микробиологические испытания, так как стандартные методы микробиологических исследований достаточно трудоемки и для получения результата требуется нескольких суток.

В связи с этим особую актуальность приобретают экспресс-методы микробиологического контроля, дающие результат в режиме реального времени и обеспечивающие возможность быстрого микробиологического анализа молочной продукции. При проведении государственного контроля (надзора) целесообразно использовать экспресс-методы взамен стандартизованных, так как классические методы в своем чашечном варианте все меньше соответствуют требованиям современных испытаний.

Целью настоящей работы является исследование новых экспресс-методов микробиологических испытаний молочной продукции, которые целесообразно использовать для целей государственного контроля (надзора) за соблюдением требований ТР ТС.

Для решения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- определить микробиологический показатель безопасности молока, вызывающий ряд серьезных заболеваний у человека;
- описать стандартизованный метод выявления данного микробиологического показателя;
- провести исследования экспресс-методов для определения микробиологических показателей, которые целесообразно использовать при проведении государственного контроля (надзора) за соблюдением требований ТР.

Основными показателями микробиологической безопасности молока являются КМА-ФАНМ, БГКП, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, стафилококки, листерии, дрожжи, плесени.

Одним из самых опасных патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* (энтеробактерии), обнаруживающихся в пастеризованном молоке при проведении государственного контроля (надзора), является род *Salmonella*. Сальмонеллами вызываются такие заболевания, как брюшной тиф и паратифы, сальмонеллезные гастроэнтериты и септицемии.

Стандартизованный метод выявления в определенной массе или объеме продукта бактерий рода *Salmonella*, включая *Salmonella Typhi* и *Salmonella Paratyphi*, устанавливается ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*». Данный стандарт является основным в перечне стандартов, содержащих правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов, к ТР ТС 033/2013. Метод используется при проведении государственного контроля (надзора) и включает этапы, отраженные на рис. 1 [5].

В соответствии с ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов» подготавливают пробу к анализу [6].

Для приготовления исходной суспензии отбирают навеску массой 25 г и разбавляют ее забуференной пептонной водой.

Для неселективного обогащения инкубируют исходную суспензию при температуре 37 ± 1 °С в течение 18 ± 2 ч.

По 1 см^3 культуры, полученной в ходе инкубирования, пересевают в 10 см^3 среды для селективного обогащения.

Через 24 ч инкубирования на селективных средах культуру пересевают для получения хорошо изолированной колонии на XLD-агар, затем помещают в термостат при температуре 36 ± 1 °С.

После инкубирования в течение 24 ч в чашках отмечают присутствующие типичные колонии бактерий рода *Salmonella* и не совсем типичные колонии, которые могут оказаться бактериями данного рода.

При отсутствии в посевах колоний для бактерий рода *Salmonella* можно утверждать об их отсутствии в анализируемой навеске продукта.

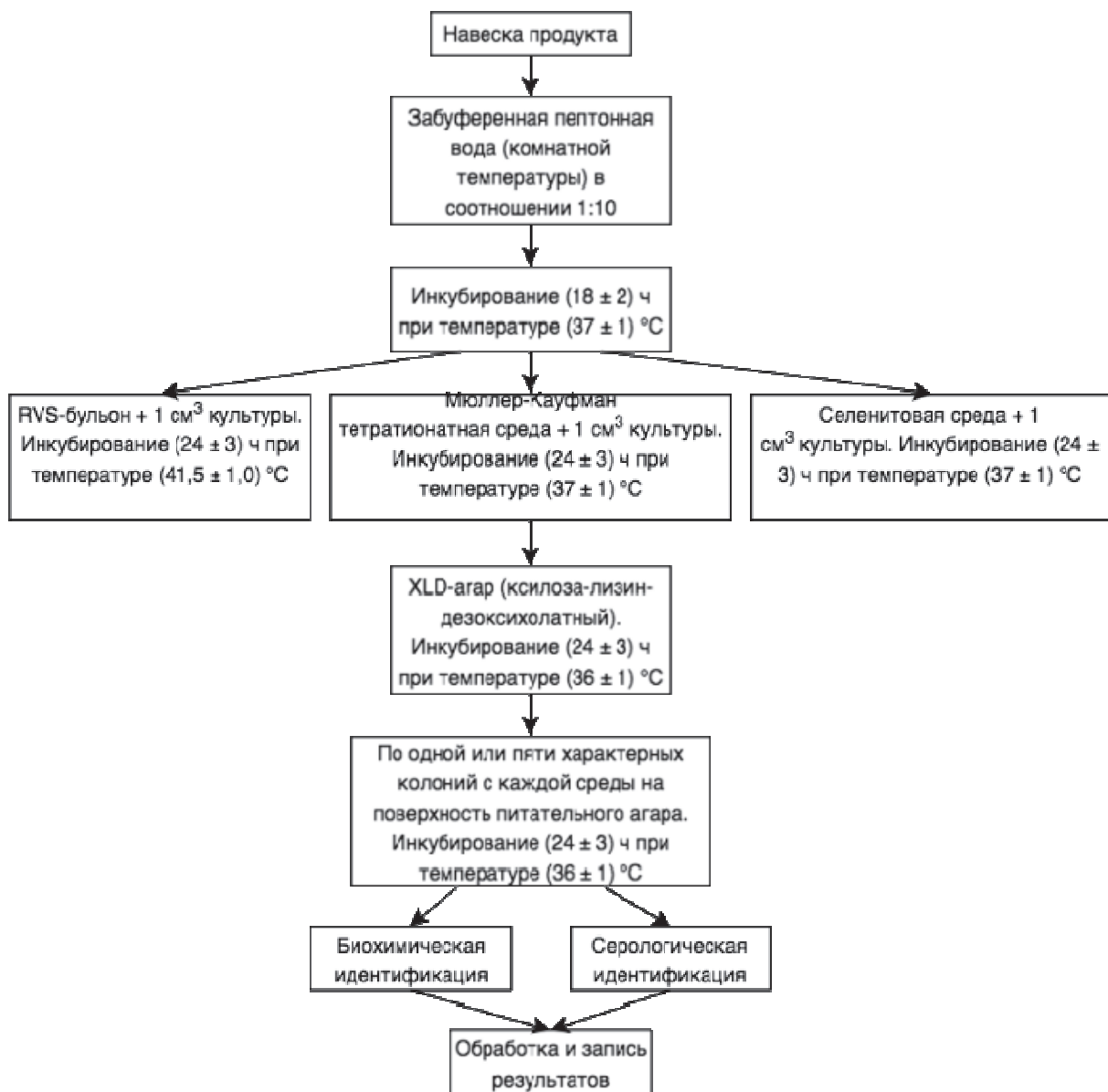


Рис. 1. Схема обнаружения сальмонелл в соответствии с ГОСТ 31659-2012
 Fig. 1. Scheme of detection of bacteria of the genus *Salmonella* in accordance with GOST 31659-2012

Если на селективно-диагностической среде присутствует минимум одна колония для бактерий рода *Salmonella*, есть необходимость их дальнейшей идентификации.

Для проведения биохимической и серологической идентификации с чашки селективной среды отбирают колонии и переносят их на поверхность предварительно подсушенного питательного агара в чашках Петри и инкубируют для последующей интерпретации тестов для испытанных колоний.

Результаты выявления бактерий рода *Salmonella* в определенной навеске продукта оценивают и записывают в протоколе испытания их обнаружение/необнаружение.

Таким образом, классический микробиологический метод позволяет выявить сальмонеллы в пастеризованном молоке в течение четырех-пяти дней, биохимическая и серологическая идентификации дополнительно занимают два-три дня. Поэтому актуальным является внедрение чувствительных экспресс-методов для определения опасных бактериальных патогенов в пищевой продукции при проведении государственного контроля (надзора) [5].

В ходе исследования экспресс-методов для микробиологических анализов были определены 3 подходящих:

1. Ускоренный метод обнаружения сальмонелл с использованием среды Раппопорта-Вассилиадиса (среда MSRV) с новобиоцином (рис. 2).

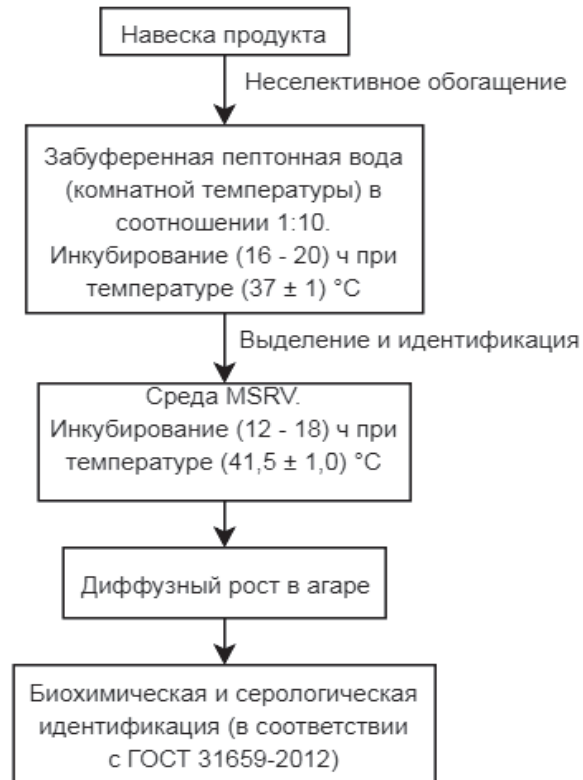


Рис. 2. Ускоренный метод обнаружения бактерий рода *Salmonella* с использованием среды MSRV

Fig. 2. Rapid method of identifying bacteria of the genus *Salmonella* using MSRV medium

Для ускоренного выделения бактерий рода *Salmonella* из пищевых продуктов используют диагностическую полужидкую среду MSRV. Наличие бактерий в полужидкой среде определяется выявлением подвижности сальмонелл, образующих светлую непрозрачную зону роста.

В связи с отсутствием этапа селективного обогащения время исследования сокращается на 24–48 ч. Сразу после проведения предварительного обогащения исследуемый образец (0,1 см³) помещается в чашку Петри со средой MSRV. Далее осуществляют инкубацию посева при температуре 41,5±1 °C в течение 12–18 ч в аэробных условиях. Если в чашке выявлено наличие сальмонелл, то вокруг места посева необходимо отметить диффузный рост колоний подвижных штаммов сальмонеллы в толще этой среды, которые окружены светлым ореолом, являющимся зоной подвижности колоний. Далее с края зоны необходимо отобрать материал для посева на дифференциально-диагностическую среду. В случае если на среде MSRV присутствует рост колоний в форме пуговицы, проводится биохимическая идентификация, которая определяет возможную причастность к неподвижным сальмонеллам.

К преимуществам метода относят:

- уменьшение затраченного времени исследования на 24–48 ч;
- высокую чувствительность;
- экономичность метода.

2. Ускоренный метод обнаружения бактерий рода *Salmonella* с использованием среды Salmosyst (рис. 3).

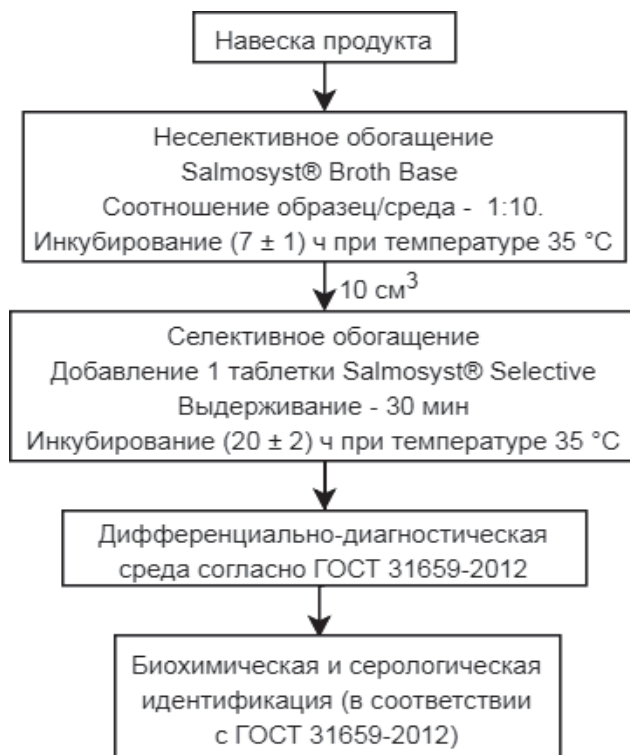


Рис. 3. Ускоренный метод обнаружения бактерий рода *Salmonella* с использованием среды Salmosyst
Fig. 3. Rapid method of identifying bacteria of the genus *Salmonella* using environment Salmosyst

Двухкомпонентная среда Salmosyst® одобрена к применению в лабораториях Роспотребнадзора и производственных лабораториях. На начальном этапе на среде Salmosyst® BrothBase проводится неселективное обогащение бактерий, которые имеются в образце (инкубирование при температуре 35 °C в течение 6–8 ч). Далее для обеспечения селективного роста сальмонелл к 10 см³ среды добавляется 1 таблетка Salmosyst Selective Supplement. Посев инкубируется при температуре 35 °C в течение 18–24 ч в аэробных условиях. После этого культуру высевают на дифференциально-диагностическую среду для последующей идентификации сальмонелл.

К преимуществам метода относят:

- уменьшение времени исследования на 24–48 ч,
- высокую чувствительность;
- простоту выполнения анализа;
- экономичность [7].

3. ИФА экспресс-тесты Singlepath для обнаружения бактерий рода *Salmonella* (рис. 4).

Иммунохроматографические экспресс-тесты Singlepath®-*Salmonella* одобрены ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора» для обнаружения сальмонелл в пищевой продукции, поскольку показывают высокую сходимость результатов.

На этапе селективного определения сальмонелл с использованием данных экспресс-тестов возникает реакция антигенов сальмонелл с высокоспецифичными антителами теста. Далее на среде Раппопорта–Вассилиадиса (RVS) производят термическую инактивацию аликвоты обогащенной пробы (2 см³), после чего 0,16 см³ вносится в лунку диагностической панели. Антигены сальмонелл, которые содержатся в пробе, взаимодействуют с антителами экспресс-теста, образуя при этом окрашенный комплекс, который выявляется визуально.

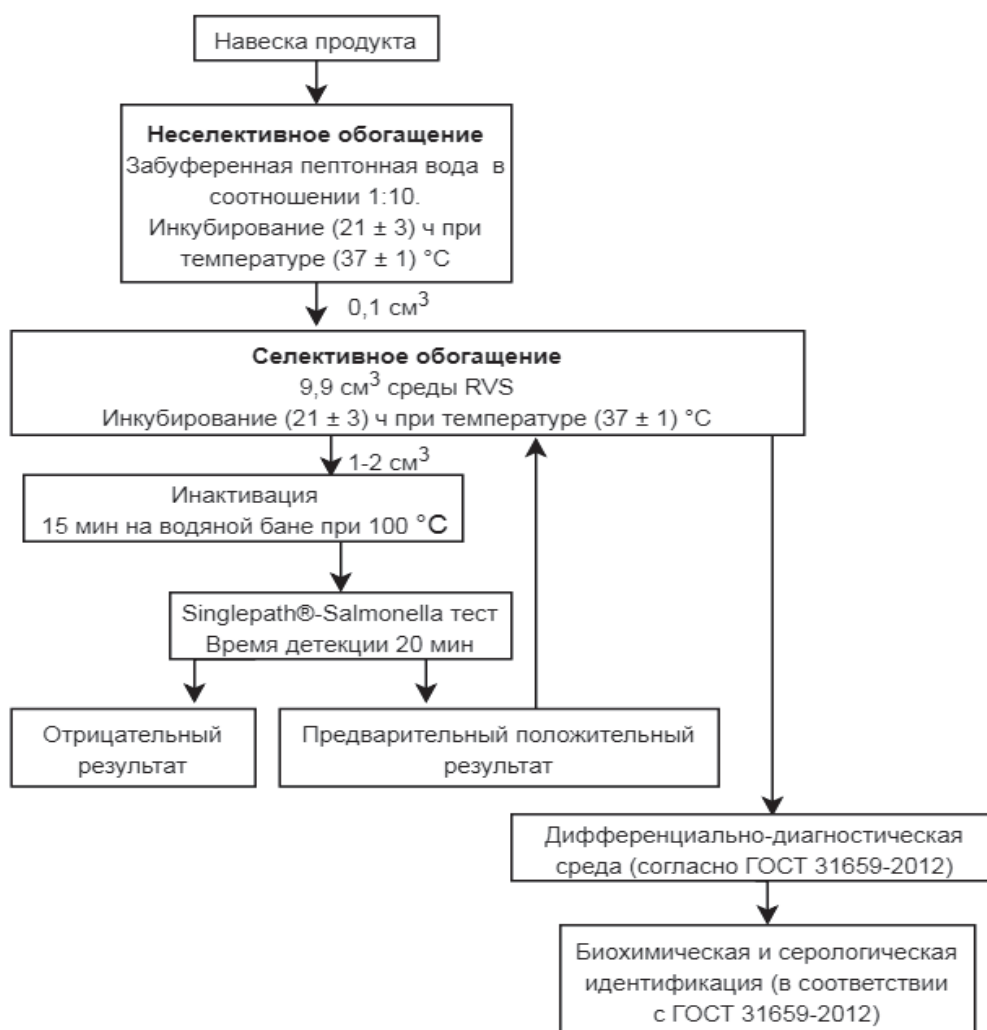


Рис. 4. Ускоренный метод обнаружения сальмонелл с использованием ИФА экспресс-тестов Singlepath®-Salmonella

Fig. 4. Accelerated method for the detection of bacteria of the genus Salmonella using rapid tests Singlepath®-Salmonella

Результат экспресс-теста считывается через 20 мин после внесения пробы. Результат положительный, если красная линия находится в тестовой (Т) и контрольной (С) зонах диагностической панели, отрицательный – если линия находится только в С-зоне (рис. 5).



Рис. 5. Иммунографический тест Singlepath® для экспрессного определения сальмонелл (слева – отрицательный ответ, справа – положительный ответ)

Fig. 5. Immunodeficiency test Singlepath® for Express determination of Salmonella (left – that's a negative, right – positive response)

После получения положительного результата культуральная жидкость высевается на дифференциально-диагностическую среду. Отрицательный результат подтверждает отсутствие сальмонеллы в испытуемой продукции. Экспресс-тест Singlepath®-Salmonella позволяет обнаруживать сальмонеллы в образце сразу после этапа селективного обогащения без дополнительных пересевов на среды.

Преимущества данного метода:

- значительное уменьшение времени анализа (на 48 ч),
- высокая специфичность и надежность определения;
- метод достаточно легкий при пробоподготовке.

К недостаткам метода можно отнести:

- вероятную ложноположительную реакцию, которая может быть связана с присутствием в пищевых продуктах инактивированных микроорганизмов или их фрагментов;
- потребность в дорогостоящем оборудовании для исследований;
- использование классического микробиологического метода для подтверждения полученных результатов [8].

Применение экспресс-методов позволит органам надзора значительно уменьшить затраты трудовых ресурсов при проведении анализа, повысить чувствительность при выявлении патогенных микроорганизмов, а также существенно сократить время, затрачиваемое на анализ.

Таким образом, есть необходимость включения экспресс-методов микробиологических испытаний молочной продукции, проводимых для целей государственного контроля (надзора) за соблюдением требований ТР, в перечень стандартов, содержащих правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов, к ТР ТС 033/2013 для их законодательного применения.

Список литературы

1. ГОСТ Р 8.820-2013. Государственная система обеспечения единства измерений. Метрологическое обеспечение. Основные положения. Введ. 2015-01-01. М.: Стандартинформ, 2014. 15 с.
2. ТР ТС 033/2013. О безопасности молока и молочной продукции. Утв. решением Комиссии Таможенного союза от 9 октября 2013 года № 67. 190 с.
3. Дунченко Н.И., Храмцов А.Г. Экспертиза молока и молочных продуктов. Качество и безопасность. Новосибирск: Сибирское унив. изд-во, 2007. 488 с.
4. Мурадова Е.О. Микробиология. М.: Эксмо, 2009. 334 с.
5. ГОСТ 31659-2012. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. Введ. 2013-07-01. М.: Стандартинформ, 2014. 20 с.
6. ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов. Введ. 1986-07-01. М.: Стандартинформ, 2010. 74 с.
7. Ускоренные методы выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах и сырье // МикроБио. URL: <http://mibio.ru> (дата обращения: 12.03.2019).
8. Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды: метод. указания (МУ 4.2.2723–10). Роспотребнадзор РФ, 2011. 111 с.

Сведения об авторах: Блинова Анна Лобсановна, старший преподаватель, e-mail: al_blinova@mail.ru;

Макаренко Дарья Викторовна, гр. СТ6-412, e-mail: dashytka-10@mail.ru.