

УДК 619: 616.076

UDC 619: 616.076

УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА КРИТИЧЕСКИ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ МЯСНОЙ И РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ, СЕРТИФИЦИРОВАННЫХ ПО СИСТЕМЕ ХАССП

RAPID METHODS OF MONITORING CRITICAL CONTROL POINTS IN THE PRODUCTION OF MEAT AND FISH PRODUCTS AT THE ENTERPRISES CERTIFIED UNDER HACCP

Ганович Геннадий Геннадьевич
аспирант

Ganovich Gennadiy Gennadyvich
postgraduate student

Денисова Елизавета Аркадьевна
к.б.н.

Denisova Elizaveta Arkadyevna
Cand.Sci.Biol.

Бабунова Вероника Сергеевна
к.в.н.

Babunova Veronica Sergeevna
Cand.Vet.Sci.

Бровкина Анна Николаевна
д.б.н.
ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии, г. Москва, Россия

Brovkina Anna Nikolaevna
Dr.Sci.Biol.
SSI VNIIVSGE, Moscow, Russia

Статья посвящена решению актуальной задачи совершенствования определения опасных факторов при мониторинге критических контрольных точек мясо и рыбоперерабатывающих предприятий с помощью ускоренных методов и автоматизированных приборов

The article is devoted to the urgent task of improving the identification of hazardous factors in the monitoring of critical control points of meat and fish enterprises using accelerated methods and automated instruments

Ключевые слова: СИСТЕМА ХАССП, УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ, МОНИТОРИНГ, КРИТИЧЕСКИЕ КОНТРОЛЬНЫЕ ТОЧКИ, ПРОИЗВОДСТВО МЯСНОЙ И РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ

Keywords: HACCP SYSTEM, RAPID METHODS, MONITORING, CRITICAL CONTROL POINTS, PRODUCTION OF MEAT AND FISH PRODUCTS

ВВЕДЕНИЕ.

Система ХАССП является важным элементом обеспечения безопасности производств. В соответствии с ее требованиями проводится контроль на всех этапах пищевой цепи, в любой точке процесса производства, где могут возникнуть опасные ситуации. Одним из основных принципов данного стандарта является разработка системы мониторинга критических контрольных точек, с целью устранения или снижения всех видов рисков безопасности. Важная роль в системе мониторинга принадлежит методам контроля. Они должны быть эффективны и достаточно экспрессны, чтобы своевременно оценить риски и принять соответствующие корректирующие мероприятия [2,4].

При производстве мясной и рыбной продукции выявлены различные критические контрольные точки: приемка и хранение сырья и готовой продукции, замораживание, копчение и другие. При этом, опасными факторами могут являться КМАФАнМ, БГКП, псевдомонады, дрожжи, плесневые грибы, микрококки, сальмонеллы, золотистый стафилококк, листерии, сульфитредуцирующие клостридии, бутулинический токсин нематоды, трематоды, скребни, токсичные элементы (Pb, As, Cd, Hg), радионуклиды, гистамин, нитрозамины, пестициды, полихлорированные бифенилы и др. [5].

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Целью работы являлась оценка некоторых ускоренных методов и средств контроля опасных факторов при мониторинге критических контрольных точек. При этом исследовались методики определения индикации сальмонелл, стафилококкового и бутуллинического токсинов с помощью иммунохроматографических индикаторных элементов (ИИХЭ), тест-системы RIDA COUNT для определения БГКП, КМАФАМ сальмонелл, дрожжей, плесени, золотистого стафилококка, методики идентификации патогенных штаммов на основе хемилюминисцентной детекции с помощью автоматической системы «Vidas» и ПЦР в режиме «реального времени», способ определения остаточных количеств антибиотиков, сульфаниламидов на основе иммуномикрочиповой технологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались: автоматическая система «Vidas»; тест-системы RIDA COUNT для определения БГКП, КМАФАМ сальмонелл, дрожжей, плесени, золотистого стафилококка; иммунохроматографические индикаторные элементы (ИИХЭ) для выявления сальмонелл и токсинов производства ФГУП «ГосНИИБП» (Россия); тест-система ИФА

RIDASCREEN (Германия) для выявления шигеллоподобного *E. coli* O157H7.

ПЦР тест-наборы для определения для идентификации возбудителей инфекций, реактивы для выделения ДНК и постановки ПЦР производства «Интерлабсервис» (Россия), Амплификацию проводили на термоциклире «Mastercycler epgradient S eppendorf realplex²» и «Rotor Gene» . При определении остаточных количеств антибиотиков, сульфаниламидов и использовали тест-системы на основе иммуномикрочиповой технологии и хемилюминометр фирмы RANDOX (Великобритания).

Объектами исследований служили образцы отобранные для мониторинговых испытаний, а также экспериментальные образцы мясного и рыбного сырья, готовой продукции искусственно контаминированные микроорганизмами и антибактериальными препаратами.

Определение критических контрольных точек и опасных факторов проводилось по ГОСТ Р 51705.3-2001.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее распространенными опасными факторами при производстве мясной и рыбной продукции являются микробные контаминации. Существующие классические методы бактериологического анализа достаточно длительные и занимают по времени несколько суток. В своих исследованиях мы проанализировали некоторые ускоренные методы и тест-системы на основе различных подходов для выявления опасных факторов микробной природы. Весьма перспективными в этом направлении являются тест-системы и методики RIDA COUNT для определения БГКП, КМАФАМ сальмонелл, дрожжей, плесени, золотистого стафилококка. Методики, прошли испытания и утверждены Россельхознадзором и Роспотребнадзором. Данный метод основан на использовании готовых стерильных сухих подложек, представляющих

собой систему с питательными средами хромогенными субстратами, специфичными для конкретного определения [1]. Подложки герметично закрыты непроницаемой мембраной, которая снимается перед посевом, закрывается после него. Пробопоготовку проб осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями. Твердые пробы продукции предварительно гомогенизировали и элюировали стерильным физраствором определяемые микроорганизмы. С поверхностей оборудования или тары делали смывы. Анализ воздушной среды осуществляли поместив подложки с удаленной пленкой в исследуемые места, или проводили предварительное концентрирование микроорганизмов в физраствор с помощью пробоотборника типа «импинджер». После нанесения исследуемых объектов на подложку, ее закрывали той же пленкой, помещали в термостат и инкубировали при соответствующих температурах от 24 до 48 часов. После инкубации осуществляли подсчет окрашенных колоний с учетом разведений и первоначального объема среды. На рисунке 1 представлены результаты определения БГКП с помощью тест-системы RIDA COUNT.

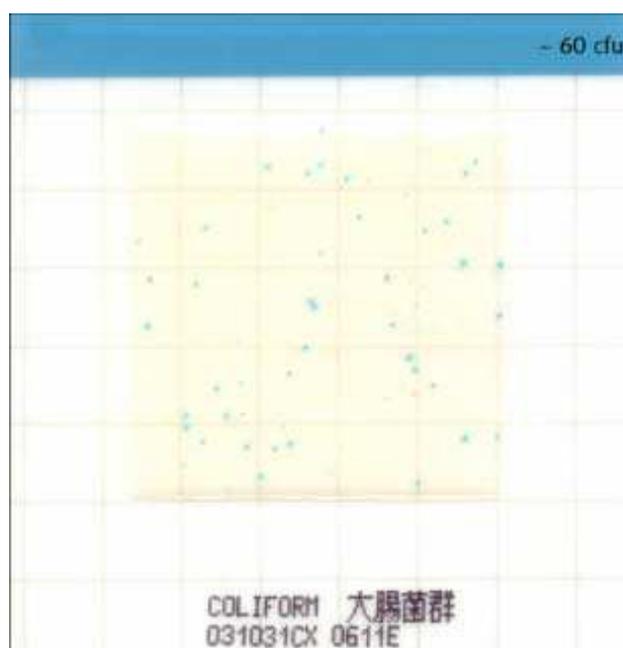


Рис.1 Результаты определения БГКП с помощью тест-системы RIDA COUNT.

Идентификацию бактерий проводили с помощью автоматизированного прибора ВИДАС с хемилюминисцентной детекцией и ПЦР в режиме реального времени. Эти методы позволяли за относительно короткий промежуток времени (при использовании автоматизированной системы для выделения ДНК при ПЦР) выявлять листерии, сальмонеллы и эшерихии, включая E.coli O157H7.

Факторами риска при контроле мясного и рыбного сырья являются остаточные количества антимикробных веществ, которые могут накапливаться в результате не соблюдения ветеринарных требований при откорме и лечении убойных животных или при попадании с кормовыми добавками при выращивании рыб в искусственных водоемах. Нами проведены исследования по оценке способа иммуномикрочипового анализа для выявления остаточных количеств антибиотиков и сульфаниламидов. В основе его лежит технология микрочипа, базирующаяся на реакции антиген-антитело с хемилюминисцентной меткой. На микрочипе иммобилизованы моноклональные антитела, специфичные к искомым антигенам. Реакция происходит в процессе сендвич – анализа (рис.2)

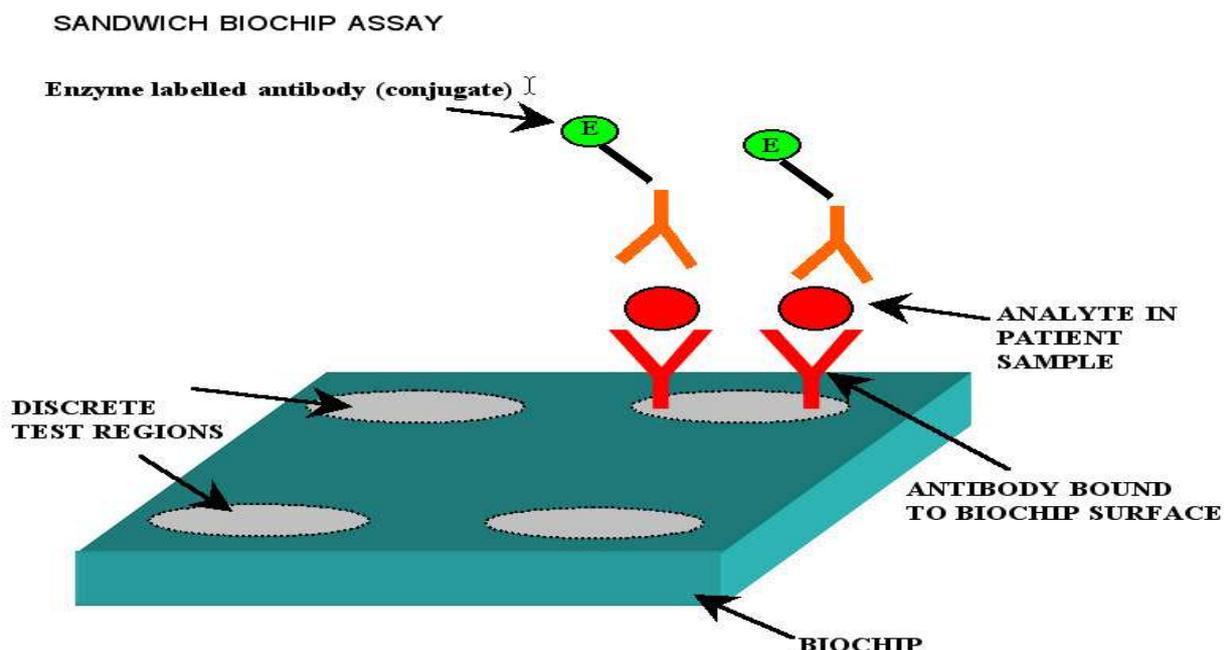


Рис. 2. Сендвич реакция на бичипе.

Световой сигнал, генерируемый каждой из тестовых зон микрочипа, определяется при помощи технологий получения цифрового изображения (рис.3). Количественная оценка осуществляется с помощью калибровочной кривой, которую строят по стандартам образца с известной концентрацией.

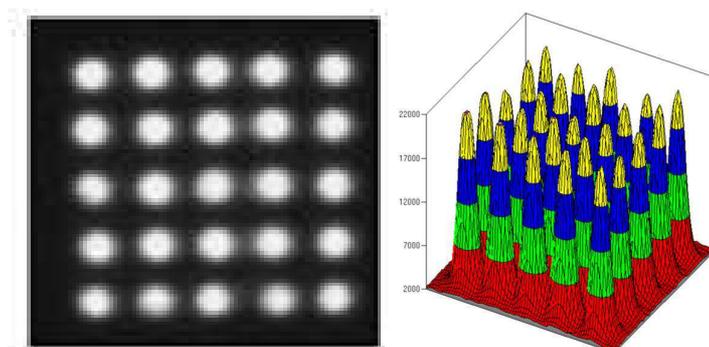


Рис. 3 Принцип детекции хемилюминисценции

Регистрация конечного результата осуществляется с помощью хемилюминометра. Время реакции составляет от 10 до 20 минут. Весь иммуномикрочиповый анализ с пробоподготовкой занимает 1 – 2 часа. В

своей работе мы использовали тест-системы и хемиллюминиметр фирмы RANDOX Великобритания. Количественное определение антибактериальных препаратов проводили по калибровочной кривой. Калибровку делали по девяти точкам по всему диапазону анализов при помощи калибраторов Randox evidence investigator для Anti Microbial Array I и Array II, и для каждой серии анализов строили новую калибровочную кривую.

Как видно из данных представленных в таблицах 1 и 2 практически все вносимые количества антибактериальных препаратов определялись с помощью данного метода.

Таблица 1.

Результаты исследования образцов мяса и рыбы, контаминированных сульфаниламидами

Внесенный сульфаниламид	Внесенное количество, мкг/кг	Выявленное количество, мкг/кг
сульфадиметоксин	5,0	4,970
сульфадимезин	120,0	119,965
сульфаметоксипиридазин	11,0	10,974
сульфаметизол	7,0	6,969

Таблица 2.

Результаты исследования образцов мяса и рыбы, контаминированных антибиотиками

Внесенный антибиотик	Внесенное количество, мкг/кг	Выявленное количество, мкг/кг
стрептомицин	220,0	221,004
цефоперазон (медоцеф)	395,0	394,978
цефтриаксон (лендацин)	10,0	9,969
левомецитин		

Весьма перспективными представляются методики и тест-системы на основе иммунохроматографического анализа, который позволяет за короткий промежуток времени контролировать наличие патогенных микроорганизмов, токсинов, в сырье, готовой продукции, в воде, воздухе и смывах с оборудования, а также трансгенных белков в растительном сырье при производстве мясорастительных полуфабрикатов и гарнира для рыбных полуфабрикатов. Сущность методики заключается в иммунной реакции антиген-антитело, происходящей между анализируемым жидким образцом и иммобилизованными в тестовой и контрольной зонах антителами, конъюгированными с коллоидным золотом.

Полученный иммунный комплекс под действием капиллярных сил перемещается по нитроцеллюлозной мембране тест-полоски, достигает аналитической зоны, где происходит его иммобилизация за счет связывания с антителами аналитической зоны. В этой зоне образуется ярко окрашенный «сэндвич» конъюгата коллоидного золота, связанного с искомыми антигенами и специфическими антителами, иммобилизованных на мембране.

Наличие 2-х окрашенных полос на мембране ИИХЭ указывает на наличие в пробе искомого аналита. Регистрацию конечного результата осуществляют визуально или с помощью рефлектметра. Рефлектметрия позволяет уменьшить такие факторы субъективности при оценке результата человеком, как освещенность рабочего места, усталость оператора или индивидуальные особенности восприятия цветов и насыщенности линий иммунохроматограммы. Нами разработаны методики контроля опасных факторов с помощью ИИХЭ при мониторинге ККТ.

Пробы исследуемых объектов отбирали согласно существующим ГОСТам. Ткани мяса или рыбы предварительно гомогенизировали и элюировали токсины 10,0 мл буферного раствора. Элюат

центрифугировали при 200g, в течение 5 мин. Аккуратно отбирали надосадочную жидкость.

Для определения токсинов в отверстие для нанесения образца ИИХЭ (для токсинов) с помощью дозатора и разового наконечника вносили одну каплю надосадочной жидкости, через 20-40 с внести еще одну каплю. Спустя 50-60 с еще одну каплю и спустя 50-60 с еще одну каплю. Общая аликвота наносимой пробы должна составить 120-150 мкл. Регистрацию результатов анализа визуально проводят спустя 25 мин.

При определении трансгенных белков необходимо отбирать верхний слой надосадочной жидкости. Держа тест-полоску в вертикальном положении пинцетом, необходимо погружали конец тест-полоски, на котором указано «sample» в микропробирку с надосадочной жидкостью. Тест-полоска должна оставаться в растворе на протяжении всего времени анализа. Продолжительность анализа составляет приблизительно 3 минуты. Появлялась контрольная полоска. Если образец положительный, то проявлялась и полоска в тест-зоне. Реакция считается законченной, когда весь окрашенный конъюгат пройдет через контрольную линию и затечет в капиллярную прокладку. Для учета результата необходимым условием является наличие окрашенной линии в контрольной зоне ИИХЭ на мембране ИИХЭ или на тест-полоске должны наблюдаться две линии вишневого цвета в аналитической и контрольной зонах. В случае проявления только одной окрашенной линии делается вывод об отсутствии в исследуемой пробе искомого токсина, либо о его присутствии в концентрациях ниже порога чувствительности ИИХЭ.

При визуальной оценке результаты анализа учитываются по интенсивности окрашивания линии в аналитической зоне: 0 баллов – полное отсутствие вишневой окраски; 1 балл – слегка видимое красное окрашивание в виде поперечной узкой полосы шириной 1 мм; 2 балла – заметное вишнево-красное окрашивание; 3 балла – четкое, хорошо

видимое окрашивание, не исчезающее в течение 5 мин после появления, границы полосы четко очерчены.

Анализ с применением ИИХЭ может производиться при температуре окружающей среды +10°-+35°С.

Критерии интерпретации результатов определения трансгенных белков представлены на рисунке 4.

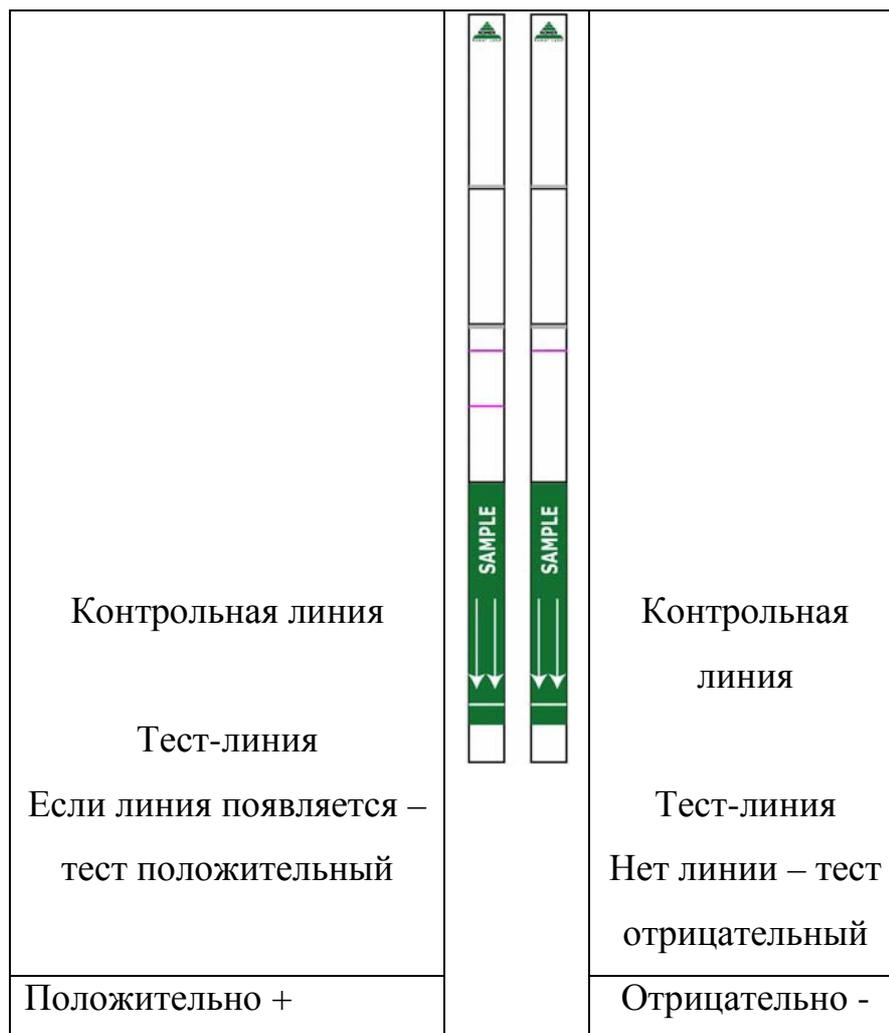


Рис. 4. Критерии интерпретации результатов определения трансгенных белков.

- Контрольная линия подтверждает, что тест работает надлежащим образом. Если контрольная линия не появляется, то это означает, что тест неработоспособен.
- Если образец положительный, то появится также и тест-линия

Если образец отрицательный, то тест-линия не проявится.

Нами проводилась также оценка разработанных методик определения бактерий с помощью ИИХЭ при мониторинге ККТ.

Методики предназначены для определения бактерий (сальмонелл, кишечной палочки, золотистого стафилококка, возбудителей особо опасных инфекций) с помощью иммунохроматографических тест-систем. Чувствительность прямого определения составляла 1×10^5 – 1×10^6 м.к./мл. Предварительное обогащение путем подращивания в селективных жидких питательных средах позволяет определять единичные клетки.

Пробы исследуемых объектов отбирают согласно существующим ГОСТам. Ткани мяса или рыбы предварительно гомогенизируют и элюируют бактерии 10,0 мл буферного раствора. Элюат центрифугируют при 200g, в течение 5 мин. Аккуратно отбирают надосадочную жидкость. Пробы воздуха отбирают в физраствор, с помощью импинджера в соответствии с инструкцией. Пробы воды отбирают с помощью пробоотборника. Смывы с поверхностей оборудования осуществляют стерильным физраствором.

При прямом определении в отверстие для нанесения образца ИИХЭ с помощью дозатора и разового стерильного наконечника вносят одну каплю жидкой пробы. Спустя 50-60 с еще одну каплю и спустя 50-60 с еще одну каплю. Итого суммарно должно быть внесено четыре капли с соблюдением указанных временных интервалов. Общая аликвота наносимой пробы должна составить 120-150 мкл. Регистрацию результатов анализа визуально проводят спустя 25 мин.

Для предварительного обогащения аликвоты жидких проб вносят дозатором со стерильным наконечником в стерильные пробирки с селективными жидкими питательными средами и подращивают в течение 4-6 часов в пробирках с селективными жидкими питательными средами при 37°C ., далее клетки осаждают при 3000g, осадок ресуспендируют в

150 мкл. буфера для анализа и вносят по каплям в отверстие для нанесения образца ИИХЭ с помощью дозатора и разового стерильного наконечника.

При визуальной оценке результаты анализа учитывались по интенсивности окрашивания линии в аналитической зоне: 0 баллов – полное отсутствие вишневой окраски; 1 балл – слегка видимое красное окрашивание в виде поперечной узкой полосы шириной 1 мм; 2 балла – заметное вишнево-красное окрашивание; 3 балла – четкое, хорошо видимое окрашивание, не исчезающее в течение 5 мин после появления, границы полосы четко очерчены.

При регистрации результата с помощью видеоцифрового анализатора «Рефлеком» (Россия), измерялась степень окрашивания зон иммунохроматограммы в условных единицах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом в результате проведенных исследований была показана возможность качественного и количественного опасных факторов (наличие микробных контаминаций, токсинов, трансгенных белков и антибактериальных веществ) при мониторинге критических контрольных точек с помощью ускоренных методов и тест-систем, а также автоматизированных приборов (хемиллюминетр фирмы RANDOX, Рефлеком, Vidas и ПЦР в режиме «реального времени», RIDA COUNT).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Замятина О.В. Принципы ХАССП. Безопасность продуктов питания и медицинского оборудования [Текст]: пер. с англ. / О.В. Замятиной. – М.: РИА «Стандарты и качество», 2006. – 232с.
2. Аронов И.З., Версан В.Г. О выборе системы управления [Текст]: ежемес. науч.- технич. журнал / Методы менеджмента качества. – М.: 2003. - №2.- С.10-12.
3. Мейес Т., Мертимор С. Эффективное внедрение ХАССП: учимся на опыте других [Текст]: уч.-к. / Т. Мейес, С. Мертимор; пер. с англ. / В. Широкова – СПб.: Профессия, 2005. – 288с.
4. Аршакуни В.Л., Устинов В.В. Система ХАССП: Российской версии – два года [Текст]: ежемес. науч.- технич. журнал / Стандарты и качество – М.: 2003. - №9. - С.85-87.
5. ГОСТ Р 51705.12-2001 Управление качеством пищевых продуктов на основе

принципов ХАССП.

6. Донченко Л.В. Безопасность пищевой продукции [Текст]: учеб. пособие / Л.В. Донченко, В.Д. Надыкта. – М.: Пищепромиздат, 2001.- 528с.

References

1. Zamjatina O.V. Principy HASSP. Bezopasnost' produktov pitaniya i medicinskogo oborudovaniya [Tekst]: per. s angl. / O.V. Zamjatinoy. – М.: RIA «Standarty i kachestvo», 2006. – 232s.

2. Aronov I.Z., Versan V.G. O vybore sistemy upravleniya [Tekst]: ezchemes. nauch.-tehnich. zhurnal / Metody menedzhmenta kachestva. – М.: 2003. - №2.- S.10-12.

3. Mejes T., Mertimor S. Jeffektivnoe vnedrenie HASSP: uchimsja na opyte drugih [Tekst]: uch-k. / T. Mejes, S. Mertimor; per. s angl. / V. Shirokova – SPb.: Professija, 2005. – 288s.

4. Arshakuni V.L., Ustinov V.V. Sistema HASSP: Rossijskoj versii – dva goda [Tekst]: ezchemes. nauch.-tehnich. zhurnal / Standarty i kachestvo – М.: 2003. - №9. - S.85-87.

5. GOST R 51705.12-2001 Upravlenie kachestvom pishhevyh produktov na osnove principov HASSP.

6. Donchenko L.V. Bezopasnost' pishhevoj produkcii [Tekst]: ucheb. posobie / L.V. Donchenko, V.D. Nadykta. – М.: Pishhepromizdat, 2001.- 528s.