

На правах рукописи

Морозова Елена Николаевна

ГАРМОНИЗАЦИЯ КРИТЕРИЕВ И МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ

16.00 06 — Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена
и ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2005

Работа выполнена в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации Государственного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Вячеслав Владимирович Светличкин
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

Официальные оппоненты:

- заслуженный деятель науки РФ

доктор ветеринарных наук, профессор

Михаил Павлович Бутко
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

- доктор биологических наук, профессор

Юрий Павлович Фомичев
(ГНУ ВНИИЖ)

Ведущая организация: Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Защита состоится « 26 » января 2005 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.006.008.01. при Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии.

Автореферат разослан « 24 » сентября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Е.С. Майстренко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Вступивший в силу 1 июля 2003 года Федеральный закон «О техническом регулировании» создал основу для проведения государственной реформы технического регулирования. Суть преобразований сводится к тому, чтобы на основе рационального сочетания свободного предпринимательства и государственного регулирования, гармонизации с международной практикой этой деятельности обеспечить безопасность продукции и повышение ее конкурентоспособности.

Реформа предопределяет необходимость гармонизации основных элементов технического регулирования, обеспечивающих безопасность и качество продукции: технических регламентов, стандартов, процедур подтверждения соответствия, аккредитации, контроля и надзора.

Одной из основных целей реформирования системы технического регулирования является повышение эффективности защиты рынка от опасной продукции. Для этого необходимо внедрение стандартов оценки безопасности и качества продуктов, отвечающих международным критериям.

Одним из основных критериев подтверждения соответствия продукции, согласно Федеральному закону «О техническом регулировании», является ее идентификация.

Идентификация продукции способствует исключению из торговли недоброкачественной и фальсифицированной продукции, представляющей серьезную угрозу для здоровья населения.

Идентификация сырья и продуктов животного происхождения является важным элементом в системе Государственного ветеринарного надзора. Актуальное значение при этом имеют такие критерии, как определение видовой принадлежности мяса и рыбы, определение видового состава мясных и рыбных продуктов и определение фальсифицирующих примесей, в частности, определение примесей из генетически модифицированных источников.

Известны различные методы идентификации продуктов животного происхождения, они основаны на электрофоретическом анализе белков, биохимических, гистологических исследованиях (Хвыля С.И. и др., 1994; Писарева В.М., 1996; Кузнецова Т.Г., 1997; Kim H. et al., 1986; Jman I.M., 1990; Rehben H., 1990; Helle A. et al., 1996; Taylor H. et al. 2000).

Весьма чувствительными и специфичными способами идентификации продуктов животного происхождения являются методы ДНК-диагностики. Они позволяют проводить анализ термообработанных образцов (Комаров А.А., Обухов И.Л., 2000; Комаров А.А., 2001, Chikuni K. et al., 1990; Hunt D.J., 1997; Kappes S.M. et al., 1997; Jamamoto M. et al., 1998; Tortaglia M. et al., 1998; Buntjer J.B., Lamine A., 1999; Lockhart D.J., Winzeler E.A., 2000).

Тест-системы на основе иммунологического анализа просты в исполнении, экспрессны и специфичны (Серегин И.Г. и др., 1997; Mecedo-Silva ., Bardos S.F., 2000).

Важным является проведение сравнительных исследований различных тест-систем идентификации с целью их оценки для использования в качестве арбитражных методов при подтверждении соответствия или в качестве скрининговых тестов при мониторинговых испытаниях.

Решение проблем идентификации сырья и пищевых продуктов внесет определенный вклад в обеспечение гарантий качества и безопасности продукции.

Учитывая, что Российская Федерация интегрирует в мировую экономику, можно ожидать глобального расширения каналов поступления на внутренний рынок широкого ассортимента пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников (ГМИ) (Романов Г.А., 2000).

Безопасность пищевых продуктов из ГМИ является ключевым фактором, определяющим возможность их широкого использования в питании. Мнения по этому вопросу противоречивы, однако потребитель должен располагать информацией о содержании в продукции ГМИ (Попова М.Ю. и др., 2003).

Во вступившем в силу Федеральном законе «О техническом регулировании» предусмотрено совершенствование систем подтверждения соответствия продукции. Большую приоритетность получило добровольное подтверждение соответствия в форме добровольной сертификации.

Добровольное подтверждение соответствия стало действенным инструментом повышения конкурентоспособности отечественных товаров, продукции и услуг на рынке.

Таким образом, совершенствование контроля безопасности и качества пищевых продуктов на основе внедрение гармонизированных методов идентификации мяса и определения компонентов из генетически модифицированных источников (ГМИ), фальсифицирующих продукцию животного происхождения, является важным аспектом подтверждения соответствия этой продукции. Актуальной задачей гармонизации механизма подтверждения соответствия продукции становится также разработка новых систем добровольной сертификации, включающих критерии и методы оценки безопасности и качества, отвечающие международным стандартам.

Цель и задачи исследований.

Целью исследований являлась гармонизация критериев и методов оценки качества и безопасности продуктов животного происхождения при подтверждении соответствия продукции.

В задачи исследований входило:

провести сравнительный анализ литературных данных по зарубежным и отечественным критериям и методам оценки безопасности и качества продуктов животного происхождения;

- гармонизировать методы определения видовой принадлежности мяса с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе иммунодиффузии и ДНК - диагностики;

- разработать модифицированную методику идентификации свинины на основе ПЦР и ДНК-диагностики;

- определить чувствительность и специфичность методов идентификации свинины на основе иммунодиффузии и ДНК-диагностики;
- разработать методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе иммунодиффузии и ДНК-диагностики;
- гармонизировать методику определения компонентов из генетически модифицированных источников (ГМИ), фальсифицирующих продукцию животного происхождения, с использованием стандартизованной по международным требованиям тест-системы на основе полимеразой цепной реакции, ДНК-гибридизации и иммуноферментного анализа;
- разработать гармонизированные критерии и методы оценки безопасности и качества сырья и продуктов животного происхождения системы добровольной сертификации "Гильдия Поставщиков Кремля".

Научная новизна:

Проведен сравнительный анализ литературных данных по зарубежным и отечественным критериям и методам оценки безопасности и качества продуктов животного происхождения и определены основные направления их гармонизации.

Проведена гармонизация критериев и методов идентификации мяса и определения ГМИ с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе полимеразой цепной реакции, ДНК-гибридизации и иммуноферментного анализа.

Проведена гармонизация методов идентификации свинины с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе иммунодиффузии и ДНК-диагностики.

Разработана модифицированная методика идентификации свинины, включающая выделение ДНК с использованием 3% СТАВ-буфера, амплификации ДИК с биотинилированными праймерами, гибридации меченных ампликонов с ДНК-зондами, иммобилизованными на планшетах и

детектирование гибридных молекул по интенсивности окрашивания после реакции с конъюгатом и субстратом.

Определены чувствительность и специфичность метода на основе иммунодиффузии, позволяющего проводить идентификацию до 5% свинины в сырье и сырых продуктах питания.

Показана высокая чувствительность и специфичность метода на основе полимеразой цепной реакции, ДНК-гибридизации и иммуноферментного анализа, позволяющего проводить идентификацию до 0,5% свинины в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных.

Показана возможность определения до 0,01% ДНК ГМИ с использованием стандартизованной тест-системы на основе амплификации с биотинилированными праймерами, последующей гибридизацией со специфичными ДНК-зондами и детектированием гибридных молекул по иммуноферментному типу.

Разработаны гармонизированные критерии и методы оценки безопасности и качества сырья и продуктов животного происхождения для системы добровольной сертификации "Гильдия Поставщиков Кремля".

Практическая ценность.

На основании результатов исследований разработаны:

«Методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе иммунодиффузии» (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 18.03.2004г.);

«Методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе ДНК-диагностики» (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 18.03.2004г.);

- разработаны требования к системе добровольной сертификации «Гильдия Поставщиков Кремля» (система добровольной сертификации

представлена для утверждения в Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии, октябрь 2004 г.).

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- заседании Ученого совета ВНИИВСГЭ (2004 г.);
- межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (2004 г.);
- IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (Москва, 2002 г.);
- II Международной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» (Москва, 2003г.);
- V Международной конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции» (Москва, 2004 г.).

Публикации. Результаты исследований отражены в 7 научных статьях.

Положения, выносимые на защиту.

- Изучение российских и международных критериев и методов оценки безопасности и качества сырья и продуктов животного происхождения и определение основных направлений их гармонизации.
- Исследования по гармонизации методов определения видовой принадлежности мяса с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе иммунодиффузии и ДНК - диагностики.
- Разработка модифицированной методики идентификации свинины на основе ПЦР и ДНК-диагностики.
- Определение чувствительности и специфичности методов идентификации свинины на основе иммунодиффузии и ДНК-диагностики.

- Исследования по гармонизации методики определения компонентов из генетически модифицированных источников (ГМИ), фальсифицирующих продукцию животного происхождения, с использованием стандартизованной по международным требованиям тест-системы на основе полимеразой цепной реакции, ДНК-гибридизации и иммуноферментного анализа.

- Разработка гармонизированных критериев и методов оценки безопасности и качества сырья и продуктов животного происхождения системы добровольной сертификации "Гильдия Поставщиков Кремля".

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложений.

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц и 12 рисунков. Список литературы включает 193 источника отечественных и зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований.

Работа проводилась в период с 2001 по 2005 гг. Диссертационная работа выполнена на основании плана научно-исследовательских работ ВНИИВСГЭ и включает часть темы 05.02.29.1.

В качестве материалов использовали Федеральный закон "О техническом регулировании", декларации Европейского Союза, "Кодекс Алиментариус", "Соглашение по применению санитарных и фитосанитарных мер" (СФС) и "Соглашение по техническим барьерам и торговле" (ТБТ), Санитарные правила и нормы (СанПиН 2.3.2.1078-01), документы Ветеринарного законодательства.

Экспериментальная часть работы проводилась в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации и лаборатории санитарной микробиологии ГНУ ВНИИВСГЭ, лаборатории "Союзэкспертиза" Торгово-промышленной палаты РФ.

Были проанализированы также литературные, патентные источники, ГОСТы, методические указания, методические рекомендации по различным методам исследования, применяемых для определения показателей безопасности и качества животноводческой продукции, включая биохимические, микробиологические, хроматографические, радиологические, иммунологические методы и методы генной диагностики.

В экспериментальных исследованиях использовали тест-наборы серии SureFood на основе ПЦР и ИФА производства Германии, предоставленные фирмой "Стайлаб", для идентификации свинины и определения ГМИ, а также тест-наборы серии PRIME, производства США, для идентификации свинины на основе метода иммунодиффузии.

2.2 Результаты исследований.

2.2.1 Совершенствование методов определения видовой принадлежности мяса на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии.

Одним из основных критериев подтверждения соответствия продукции, в свете новой концепции технического регулирования, является ее идентификация.

Появление в обороте недоброкачественной, фальсифицированной мясной продукции, несоответствующей международным стандартам, представляет серьезную угрозу для здоровья населения.

Гармонизация методов идентификации продукции может проводиться как путем прямого внедрения существующих стандартизованных по международным требованиям тест-систем, так и разработкой новых тест-систем отвечающих международным стандартам.

За рубежом для обеспечения строгого соответствия условий производства тест-наборов и реагентов и их стандартизации приняты требования системы сертификации серии ISO 9000

Наиболее перспективными в плане определения видовой принадлежности мяса и мясопродуктов являются иммунологические методы и методы ДНК-диагностики.

Задачей первого этапа наших исследований являлась гармонизация методов определения видовой принадлежности мяса с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе иммунодиффузии и ДНК - диагностики.

Для решения этой задачи использовали тест-систему серии PRIME производства США и тест-систему серии SureFood, производства Германии для идентификации мяса и мясных продуктов из свинины.

Наборы реагентов выпускаются под контролем системы качества сертификации по стандарту ИСО - 9001.

Тест системы серии PRIME дают возможность идентифицировать свинину в мясопродуктах иммунологическим методом. Принцип реакции (метод иммунодиффузии по Оухтерлони) основан на диффузии диагностических антител и испытуемого антигена из пропитанных дисков в гель, при этом в случае их взаимодействия образуется полоса преципитации между противоположными дисками.

Компонентами анализа являются испытуемый материал (сырое мясо, мясопродукты), диски с иммобилизованными антителами к белкам свинины и диски сравнения с иммобилизованными антигенами.

Всего исследовано 10 образцов в 3 повторностях.

Исследование выполнялось в несколько стадий.

От образца исследуемой продукции отбирали пробу по возможности без жира и соединительной ткани, соблюдая меры предосторожности, для предотвращения загрязнения исследуемой пробы мясным соком предыдущих проб;

Постановка реакции иммунодиффузии занимала по времени 10-20 минут (без учета времени доведения всех компонентов набора до комнатной температуры) и заключалась в следующем: на чашку с гелем пинцетами размещали в подписанные на геле зоны соответствующие диски, уже пропитанные специфичными антителами; диск, пропитанный

соответствующим антигеном и диски, пропитанные мясным соком исследуемых образцов.

Далее чашку инкубировали в термостате с постоянной комнатной температурой в течение суток.

Учет и оценку результатов проводили визуально по линии преципитации между дисками.

Показана высокая чувствительность и специфичность метода на основе иммунодиффузии, позволяющего проводить идентификацию до 5% свинины в сырье и сырых продуктах питания (таблица 1).

Таблица 1

№ п/п	Исследуемые образцы	Специфичные антигены для идентификации образцов методом иммунодиффузии
		свинина
1	2	3
1	Сырая говядина	-
2	Сырая свинина	+
3	Сырая баранина	-
4	Сырое мясо курицы	-
5	Сырая свинина 50 %, курица 50 %	+
6	Сырая свинина 80 %, курица 20 %	+
7	Сырая свинина 95 %, курица 5 %	+
8	Сырая говяжья печень	-
9	Сырой шницель	+
10	Сырой бифштекс	-

+ - положительная реакция преципитации

- - отрицательная реакция преципитации

Набор SureFood® показал возможность ускоренно и эффективно идентифицировать видоспецифичную ДНК различных животных в составе

продовольственного сырья, кормов и готовой пищевой продукции посредством полимеразой цепной реакции (ПЦР), ДНК-гибридизации и детектирования гибридных молекул на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

Благодаря короткому размеру продукта ПЦР (размер ампликона составляет 125 пар оснований), определение видоспецифичной ДНК может выполняться не только в продовольственном сырье, но и в образцах, подвергнувшихся глубокой переработке, например, в готовых пищевых продуктах, мясокостной муке, комбикормах и т.д.

В задачи наших исследований входило определение чувствительности и специфичности метода для идентификации свинины.

Всего исследовано 27 образцов в трех повторностях.

Исследование выполнялось в три стадии:

1. Изоляция и очистка ДНК исследуемой пробы (использовались реагенты наборов SureFood PREP Aimal из проб продовольственного сырья и не термообработанных пищевых продуктов и SureFood PREP Aimal X из проб продовольственного сырья и пищевых продуктов, подвергнутых термической обработке).

2. ПЦР амплификация фрагмента общего гена с помощью специфического биотинилированного праймера.

3. Детекция ПЦР-ампликонов в лунках ИФА-планшета с помощью специфических гибридных зондов

Связывание биотинилированных продуктов ПЦР в лунках стрептавидин-покрытого планшета.

- Денатурирование связанных продуктов ПЦР и удаление несвязанных нитей ДНК.

- Гибридизация связанных продуктов ПЦР с помощью специфических меченых зондов.

- Детекция гибридных зондов с помощью иммуносорбции антител с последующей цветной реакцией.

Показана высокая чувствительность и специфичность метода с использованием тест-системы серии SureFood, позволяющего проводить идентификацию до 0,5% свинины в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных (Таблица 2).

Таблица 2

№ п/п	Описание образца	Идентификация видоспецифичной ДНК / код зонда
		свинина
1	2	3
1	Сырая говядина	-
2	Сырая свинина	+
3	Сырая баранина	-
4	Сырая курица	-
5	Сырой гусь	-
6	Сырая индейка	-
7	Сырая индоутка	-
8	Сырая утка	-
9	Сырая свинина 5%, индейка 95%	+
10	Сырая свинина 1%, индейка 99%	+
11	Сырая свинина 0,5 %, индейка 99,5%	+
12	Сырая свинина 0,5 %, говядина 99,5%	+
13	Сырые пельмени "Моя семья"	-
14	Говяжий паштет "Name", Чешская респ., п/н банки 27/96	+
15	Гусиный паштет "Name", Чешская респ., п/н банки 26/96	-
16	Вареная говядина	-
17	Вареная свинина	+
18	Вареная баранина	-
19	Вареная курица	-
20	Вареный гусь	-

1	2	3
21	Вареная индейка	-
22	Вареная индоутка	-
23	Вареная утка	-
24	Вареная колбаса	+
25	Сырокопченая колбаса "Брауншвейгская", Микояновский МК, ГОСТ 16131-86	+
26	Говяжий студень	-
27	Свиной студень	+
28	Желатин, "Распак", ГОСТ 11293-89	+

+ - положительная реакция

- - отрицательная реакция

Предложенные методы и тест-системы могут быть использованы как в научных исследованиях, так и в широкой практике для контроля качества продукции и выявления фальсифицирующих примесей.

2.2.2. Разработка модифицированной методики идентификации свинины на основе ПЦР и ДНК-гибридизации.

Как было показано в предыдущем разделе, тест-набор серии SureFood позволял с высокой чувствительностью и специфичностью проводить идентификацию свинины. Однако, методика пробоподготовки достаточно длительная, трудоемкая, включает много этапов центрифугирования, а также использование дорогостоящих препаратов протеиназы К и хроматографических колонок для очистки ДНК.

С целью оптимизации способа идентификации свинины нами разработана методика на основе амплификации и ДНК-гибридизации с модифицированной пробоподготовкой.

Для выделения ДНК использовали СТАВ-буфер, состоящий из 3%-СТАВ, 1.4М-NaCl, 100ММ TrisHCl до pH 8.0 и 20мМ EDTA. СТАВ-буфер, в более низких концентрациях он применялся ранее для идентификации говядины.

1 г мяса или мясной продукции гомогенизировали, с 10 мл нагретого до 65 °С СТАВ-буфера. Гомогенат инкубировали при температуре 65 °С в течение 30 мин. Остатки разрушенных тканей осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 500g. К супернатанту добавляли равный объем хлороформа и встряхивали в течение 10 мин. Центрифугировали 5 мин при 500g. Отбирали верхнюю водную фазу и еще раз повторяли обработку хлороформом. К полученному объему раствора ДНК добавляли двойной объем охлажденного до 0°С изопропанола и осаждали ДНК центрифугированием при 5 000 g в течение 10 мин, осадок ДНК подсушивали и растворяли в дистиллированной воде. Далее проводили ПЦР, гибридизацию с ДНК-зондами на свинину и детектирование гибридных молекул по иммуноферментной методике с компонентами тест-набора SureFood.

При анализе термообработанных продуктов проводили экстракцию ДНК с помощью СТАВ-буфера, однократную депротеинизацию изопропанолом и дальнейшую очистку ДНК, амплификацию, гибридизацию и детектирование гибридных молекул с компонентами набора SureFood.

Как показали исследования, выход ДНК по модифицированной методике был на уровне или несколько превышал количество ДНК, получаемое при использовании тест-системы SureFood. При этом соотношения оптических плотностей $E_{260/280}$ и $E_{260/230}$ равнялось соответственно 1,8 и 2, что свидетельствовало о достаточной очистке ДНК от белка и полисахаридов.

Данные, приведенные в таблице 3, показывают высокую специфичность идентификации свинины по модифицированной методике и корреляцию результатов с результатами, полученными с использованием тест-набора SureFood.

Таблица 3

Специфичность идентификации свинины с использованием различных методов

Исследуемые образцы	Результаты выявления ДНК свиньи	
	с помощью модифицированной методики	с помощью методики SureFood
Сырая свинина	+	+
Сырая говядина	-	-
Сырая индейка	-	-
Сырая свинина 0,5 %, индейка 99,5%	+	+
Вареная свинина	+	+
Сырокопченая колбаса «Брауншвейгская»	+	+
Вареная колбаса	+	+

Таким образом, разработанная модифицированная методика позволяет оптимизировать пробоподготовку при идентификации свинины, сократив при этом в 2 раза количество этапов пробоподготовки и исключив использование дорогостоящих препаратов К протеиназы, а для сырых продуктов и хроматографических колонок.

2.2.3. Сравнительный анализ и гармонизация методов определения компонентов из ГМИ, фальсифицирующих продукцию животного происхождения.

Как известно, для определения ГМИ используются методы генной диагностики: полимеразно - цепная реакция, ДНК-микрочиповая технология и анализ нуклеотидных последовательностей, амплификация генов с последующей ДНК-гибридизацией, а также метод иммуноферментного анализа.

• В настоящее время как у нас в стране, так и за рубежом определение ГМИ проводят по 35 S промотору и NOS терминатору. Эти нуклеотидные

последовательности являются в настоящее время универсальными областями растительных ДНК, участвующими в трансформации генов, поэтому они были взяты за основу при разработке международных стандартов и российских ГОСТов для определения ГМИ.

В качестве арбитражного количественного метода при определении ГМИ принят метод ПЦР в реальном времени.

Однако, при проведении большого числа мониторинговых исследований сначала используют недорогостоящий качественный ПЦР - анализ.

При этом наборы, основанные на классической схеме с использованием электрофореза, делают анализ несколько трудоемким.

На следующем этапе наших исследований мы проводили оценку возможности использования наборов SureFood США для выявления ГМИ в растительных продуктах. Как было уже отмечено, производство наборов серии SureFood стандартизовано по международной системе ИСО 9000.

Набор SureFood дает возможность ускоренно и эффективно идентифицировать специфичную ДНК промотора 35S и терминатора NOS в составе продовольственного сырья, кормов и готовой пищевой продукции посредством полимеразой цепной реакции (ПЦР), ДНК-гибридизации и детектирования гибридных молекул на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

В процессе испытаний были получены результаты, подтверждающие высокую специфичность и чувствительность определения ГМИ с помощью тест-системы серии SureFood.

Чувствительность тест-системы серии SureFood позволяла выявлять до 0,01% ДНК ГМ-происхождения (таблице 4).

Показана корреляция результатов определения ГМИ с помощью тест-системы серии SureFood и классической методики с использованием электрофореза.

Таблица 4

Определение чувствительности тест-системы серии SureFood для определения ГМИ

Процент трансгенной ДНК	Результаты анализа (по интенсивности окрашивания гибридных молекул)	
	Для промотора 35S	Для терминатора NOS
1	2	3
5%	++++	++++
1%	++++	++++
0,5%	++++	++++
0,1%	+++	+++
0,05%	++	++
0,01%	+	+
Положительный контроль	++++	++++
Отрицательный контроль	-	-

Полученные результаты свидетельствуют о том, что тест-система SureFood обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Она более практична в исполнении по сравнению с классической методикой с использованием электрофореза, позволяет проводить компьютерное протоколирование конечного результата и вследствие этого может быть рекомендована для качественного определения ГМИ.

2.2.4. Гармонизация критериев и методов оценки качества и безопасности сырья и пищевых продуктов в системе добровольного подтверждения соответствия.

На следующем этапе были проведены исследования по разработке требований системы добровольной сертификации «Гильдия Поставщиков Кремля».

Основной целью при разработке системы являлось создание требований для получения высококачественных продуктов питания.

Система должна предусматривать оценку не только самой продукции, но и предприятий выпускающих эту продукцию.

Для оценки предприятий, производящих продукцию, были выбраны критерии ХАССП (англ. НЛССР - Hazard Analysis and Critical Control Points - анализ рисков и критические точки), которая является основной моделью управления качеством и безопасностью продукции на пищевых предприятиях развитых стран мира.

С использованием приведенных выше гармонизированных критериев и методов оценки безопасности и качества продукции, нами были разработаны требования для добровольной системы сертификации «Гильдия Поставщиков Кремля».

Система сертификации «Гильдия Поставщиков Кремля» основана на критериях применяемых к детскому питанию и включает дополнительные гармонизированные требования:

- не допускается наличие в мясе и мясопродуктах антибиотиков (пенициллина и стрептомицина);
- не допускается наличие в мясе и мясопродуктах субстанций, обладающих анаболическим эффектом (стильбенов, тиреостатиков, стероидов, зеранола, тренболон ацетата, меленгестрол ацетата, дексаметазона, гестагенов);
- не допускается наличие в мясе и мясопродуктах хлорорганических соединений (полихлорированные бифенилы, альдрин, гептахлор, эндрин);
- не допускается наличие в мясе и мясопродуктах антибактериальных препаратов (сульфаниламидов и квинолов);
- не допускается наличие в мясе и мясопродуктах антигельминтиков (ивермектинов, авермектинов, тиабендазола, триклабендазола, фенбендазола, оксифендазола, эприномектина);
- выявляются радиационно-обработанные продукты питания (допустимый уровень 10 кГр);
- в 25 г мясной продукции не допускается наличие микроорганизмов (*Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* Jejuni, *Yersinia enterocolitica*);

в мясных продуктах допускается содержание генетически-модифицированных примесей не более 1%.

Таким образом, разработанная система добровольной сертификации содержит критерии и методы оценки качества и безопасности продуктов животного происхождения, отвечающие международным нормам, что является существенным вкладом в гармонизацию систем подтверждения соответствия в свете новой концепции технического регулирования.

ВЫВОДЫ

1. Анализ научно-технической литературы показал, что критерии и методы оценки безопасности и качества продукции, в том числе животного происхождения требуют гармонизации в различных аспектах технического регулирования: в системах Государственного контроля и надзора, в системах подтверждения соответствия, при стандартизации.

2. В соответствии с новой концепцией технического регулирования, добровольная сертификация приобретает важную роль в системах подтверждения соответствия как механизм, повышающий конкурентоспособность продукции и обеспечивающий ее безопасность и качество.

3. Проведена гармонизация критериев и методов идентификации мяса и определения ГМИ с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе полимеразой цепной реакции, ДНК-гибридизации и иммуноферментного анализа.

4. Разработана модифицированная методика идентификации свинины, включающая выделение ДНК с использованием 3% СТАВ-буфера, амплификации ДНК с биотинилированными праймерами, гибридизацию меченных ампликонов с ДНК-зондами, иммобилизованными на планшетах, и детектирование гибридных молекул по интенсивности окрашивания после реакции с конъюгатом и субстратом.

5. Чувствительность и специфичность метода на основе иммунодиффузии, позволяющего проводить идентификацию до 5% свинины в сырье и сырых продуктах животного происхождения.

6. Показана высокая чувствительность и специфичность метода на основе амплификации с последующей гибридизацией, позволяющего проводить идентификацию до 0,5% свинины в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных.

7. Проведена гармонизация метода определения компонентов из ГМИ, фальсифицирующих продукцию животного происхождения с использованием стандартизованной тест-системы на основе амплификации с биотинилированными праймерами, последующей гибридизацией со специфичными ДНК-зондами и детектированием гибридных молекул по иммуноферментному типу. Чувствительность метода позволяла определять до 0,01% ДНК ГМИ. Метод более практичен в исполнении, по сравнению с классической методикой с использованием электрофореза, позволяет проводить компьютерное протоколирование конечного результата и вследствие этого может быть рекомендована для качественного определения ГМИ.

8. Разработаны требования системы добровольной сертификации "Гильдия Поставщиков Кремля". Система добровольной сертификации содержит гармонизированные критерии и методы оценки качества и безопасности продуктов животного происхождения, отвечающие международным нормам.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Для использования в научных учреждениях и исследовательских лабораториях могут быть рекомендованы разработанные нами:

Методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе иммунодиффузии (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии, 18.03.2004г.);

Методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе ДНК-диагностики (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии, 18.03.2004г.);

- Разработаны требования к системе добровольной сертификации «Гильдия Поставщиков Кремля» (система добровольной сертификации представлена для утверждения в Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии, октябрь 2004 г.).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Морозова Е.Н. / Об изменениях внесенных в ГОСТ "Рыба мороженая" // Материалы 4-ой Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции", МГУПБ, Москва, 2002, стр. 82-83.

2. Морозова Е.Н. / Анализ современного состояния международных и отечественных критериев и методов оценки безопасности и качества продукции животного происхождения // Труды ВНИИВСГЭ "Проблемы ветеринарной санитарии и экологии", Москва, 2003, стр. 21-27.

3. Морозова Е.Н. / Вопросы гармонизации отечественных правил и методов оценки безопасности и качества животноводческой продукции с международными нормативными документами // Материалы II Международной научной конференции студентов и молодых ученых "Живые системы и биологическая безопасность населения", МГУПБ, Москва, 2003, стр.6-8.

4. Светличкин В.В., Писарева В.М., Кононенко А.Б., Галкин А.В., Морозова Е.Н., Тихомирова Т.А., Маргиева С.А., Соколова Ю.Н. / Видовая принадлежность мяса на основе ДНК-диагностики // "Практик", 2004, № 3-4, стр. 30-33.

5. Светличкип В.В., Писарева В.М., Кононенко А.Б., Кузькин Б.П., Галкин А.В., Морозова Е.И., Тихомирова Т.А., Маргиева С.А., Узунян Д.Г. / Определение видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе иммунодиффузии // "Практик", 2004, № 7-8, стр. 28-31.

6. Морозова Е.Н., Маргиева С.А., Писарева В.М., Родин В.И., Светличкин В.В. / Идентификация мяса и мясопродуктов с использованием стандартизованных тест-систем ДНК- и иммунодиагностики // Материалы V Международной конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции", МГУПБ, Москва, 2004, стр. 29 -30.

7. Смирнов А.М., Туник А.Н., Светличкин В.В., Писарева В.М., Коноиенко А.Б., Морозова Е.Н. / Определение видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии // «Ветеринария», 2004, принята в печать.

10 FEB 2005

1731