

На правах рукописи

Узунян Давид Григорьевич

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ И ТЕХНИЧЕСКИХ СРЕДСТВ
ИДЕНТИФИКАЦИИ МЯСА НА ОСНОВЕ ДНК- И
ИММУНОДИАГНОСТИКИ**

16.00.06 – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена
и ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2006

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Светличкин Вячеслав Владимирович
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

Официальные оппоненты:

- доктор ветеринарных наук, профессор

Долгов Виктор Андреевич
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

- доктор биологических наук, профессор

Фомичев Юрий Павлович
ГНУ Всероссийский
научно-исследовательский
институт животноводства (ГНУ ВНИИЖ)

Ведущая организация: Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Защита состоится «11» октября 2006 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д.006.008.01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт 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 Россельхозакадемии.

Автореферат разослан «_____» сентября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.С. Майстренко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Повышение защиты рынка от опасной и контрафактной продукции является одной из главных целей проходящей в настоящее время реформы технического регулирования.

В этой связи, разработка эффективных методов и тест-систем идентификации мяса способствует исключению из торговли недоброкачественной и фальсифицированной продукции, представляющей серьезную угрозу для здоровья населения.

При идентификации используются различные методические подходы, основанные на органолептических показателях, 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).

Экспрессны и достаточно специфичны тест-системы на основе иммунологического анализа (Серегин И.Г. и др., 1997; Mecedo-Silva ., Bardos S.F., 2000).

Методы ДНК-диагностики показали себя весьма чувствительными и специфичными способами идентификации мяса, позволяющими проводить анализ термообработанных образцов (Комаров А.А., Обухов И.Л., 2000; Комаров А.А., 2001, Комарова И.Н., 2005; 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.).

Однако, актуальными остаются задачи оптимизации методов и тест-систем применительно к конкретным видам мяса, а также к различным образцам сырья и продукции. При этом задачи гармонизации критериев и методов оценки безопасности и качества продукции предусматривают как внедрение уже известных стандартизованных по международным

требованиям тест-систем идентификации, так и разработку новых методов и тест-систем, отвечающих международным стандартам. Существует необходимость разработки как высокочувствительных и специфичных арбитражных методов для специализированных лабораторий, так и экспрессных тест-систем и технических средств для нестационарного анализа, например, для ветсанэкспертизы на рынках, предприятиях мясоперерабатывающей промышленности, холодильных комбинатах при приемке сырья и продукции.

Весьма важным является изучение влияния биологических и физико-химических факторов, возникающих при хранении и термической обработке мяса, на эффективность методов и тест-систем идентификации.

Цель и задачи исследований

Целью исследований являлась разработка методов и тест-систем идентификации мяса на основе ДНК-диагностики и изучение влияния биологических и физико-химических факторов, возникающих при хранении и термической обработке мяса на эффективность тех или иных методов и тест-систем идентификации.

В задачи исследований входило:

- совершенствовать методы идентификации мяса птицы с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе ДНК и иммунодиагностики;
- разработать опытные образцы укладки тест-систем и технических средств для реализации методов идентификации в нестационарных условиях;
- определить чувствительность и специфичность методов идентификации мяса на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии;
- провести сравнительный анализ влияния условий хранения и термической обработки мяса на эффективность методов идентификации;

- разработать методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии.

Научная повизна.

Проведено совершенствование методов идентификации мяса птицы с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе ДНК- и иммунодиагностики. Показана высокая чувствительность и специфичность методов на основе амплификации, ДНК-гибридизации и иммуноферментного анализа, позволяющих проводить идентификацию до 0,1% мяса птицы в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных. Чувствительность идентификации мяса птицы методом иммунодиффузии составляла 5%.

В результате исследований разработан опытный образец портативной укладки тест-систем и технических средств определения видовой принадлежности мяса на основе ДНК-гибридизации и иммунодиффузии.

В состав технических средств укладки входят: минитермостат с автономным источником питания от 12 В, позволяющий проводить реакции ДНК-гибридизации и иммунодиффузии, автоматические дозаторы, мембранные фильтры 0,45 мкм, пассивный холодильник с пробирками и флаконами для хранения реагентов.

На основе ДНК-гибридизации с ДНК-зондами, мечеными биотином, разработаны опытные образцы тест-системы для определения видовой принадлежности мяса в нестационарных условиях. В состав тест-системы входят реагенты для выделения ДНК и постановки реакции гибридации.

Тест-системы на основе ДНК-гибридизации с ДНК-зондами, мечеными биотином, позволяли определять до 1% искомой ДНК в смешанных мясных фаршах.

Проведен сравнительный анализ влияния способов технологической обработки мяса на эффективность методов идентификации. Показаны

преимущества методов на основе ДНК-диагностики и возможности их использования после процедуры размораживания/оттаивания и после термической обработки.

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.).

- Методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса с помощью тест-систем и технических средств укладки на основе генных зондов, меченных биотином (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии, 09.11.2005 г.).

- Технические условия 9388-004-7703052541-2005 Укладка тест-систем и технических средств определения видовой принадлежности мяса на основе генных зондов, меченных биотином (Утверждены ГНУ ВНИИВСГЭ 28.11.2005 г.).

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- V Международной конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции» (Москва, 2004 г.).

- заседании Ученого совета ВНИИВСГЭ (2005 г.);

- межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (2006г.);

- Международной научно – практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных» Москва, МГУ ПБ, 2006 г.

Публикации. Результаты исследований отражены в 4 научных статьях.

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 122 страницах машинописного текста, содержит 17 таблиц и 5 рисунков. Список литературы включает 201 источник отечественных и зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа проводилась в период с 2001 по 2006 гг. Экспериментальная часть работы проводилась в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации ГНУ ВНИИВСГЭ, лаборатории "Союзэкспертиза" Торгово-промышленной палаты РФ и на хладокомбинате «ООО Фрегат-холод»

В экспериментальных исследованиях использовали тест-наборы серии SureFood на основе ПЦР и ИФА производства Германии, а также тест-наборы серии PRIME производства США, для идентификации мяса на основе метода иммунодиффузии.

Выделение и очистку ДНК животных из проб продовольственного сырья и пищевых продуктов, подвергнутых термической обработке, проводили с помощью тест-набора SureFood® PREP Animal X аналогичным образом.

Идентификацию ПЦР-ампликонов проводили путем гибридизации со специфическими гибридизационными зондами в лунках ИФА-планшета по следующей схеме:

- 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 меченных зондов;
- детекция гибридизационных зондов с помощью иммуносорбции антител с последующей цветной реакцией.

Идентификацию мяса иммунологическим методом проводили методом иммунодиффузии по Оухтерлони. Метод 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. Исследования проводились с использованием тест-систем и технических средств укладки с биотинилированными ДНК-зондами.

Во всех экспериментах использовалось не менее пяти повторностей.

2.2 Результаты исследований.

2.2.1 Совершенствование методов идентификации мяса птицы на основе иммунодиффузии.

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

Тест-системы серии ORBIT, PRIME, SOFT, PROFIT дают возможность определять видовую принадлежность мяса и мясopодуlктов иммунологическим методом. Диагностические антитела и испытуемый антиген наносили на диски. После диффузии в гель, в случае положительной реакции появлялась полоса преципитации между противоположными дисками.

В исследованиях использовали тест-систему PROFIT- набор реагентов и материалов для идентификации мяса птицы.

Данные тест-системы могут быть использованы для исследования только сырого мяса и не предназначены для анализа термообработанных продуктов.

Для идентификации видовой принадлежности нами были исследованы следующие образцы животноводческой продукции:

- мясо кур;
- говядина, свинина, баранина;
- полуфабрикат: котлета по-киевски
- сырой мясной фарш: мясо говядины 50% в смеси с мясом кур 50%;
мясо говядины 95% в смеси с мясом кур 5%; мясо говядины 96% в смеси с мясом кур 4%,

Постановка реакции иммунодиффузии занимала 10 - 20 минут.

В процессе испытаний были получены результаты, подтверждающие высокую специфичность, чувствительность определения мяса птицы (до 5%) и легкость в применении тест-систем серии PROFIT (таблица 1).

Таблица 1

Результаты идентификации мяса на основе иммунодиффузии с использованием тест-системы PROFIT

Исследуемые образцы	Результаты преципитации
сырая говядина 50 %, сырое мясо кур 50 %	+
сырая говядина 95 %, сырое мясо кур 5 %	+
сырое мясо кур	+
сырая говядина 96 %, сырое мясо кур 4 %	-
сырая говядина	-
сырая свинина	-
сырая баранина	-
котлета по-киевски (полуфабрикат)	+

(+) - положительная реакция, (-) отрицательная реакция преципитации

2.2.2 Совершенствование методов идентификации мяса птицы с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе ДНК – диагностики.

Задачей следующего этапа наших исследований являлась опробования методов определения видовой принадлежности мяса птицы с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе ДНК – диагностики.

Для решения этой задачи использовали тест-системы серии SureFood производства Германии для идентификации мяса и мясных продуктов.

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

Набор SureFood[®] дает возможность ускоренно и эффективно идентифицировать видоспецифичную ДНК птицы 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 отличие от методов ПЦР с последующим электрофоретическим разделением ампликонов он более чувствителен, удобен для практической работы и архивации конечного результата.

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.

ДНК выделяли и очищали из исследуемой пробы (использовались реагенты наборов SureFood[®] PREP Aimal для проб продовольственного сырья и пастеризованных пищевых продуктов и SureFood[®] PREP Aimal X для проб продовольственного сырья и пищевых продуктов, подвергнутых термической обработке).

Проводили ПЦР амплификацию ДНК с помощью биотинилированных праймеров и полученные ампликоны гибридизовали со специфическими мечеными ДНК-зондами.

Результаты гибридизации определяли после реакции с субстратом и красителем визуально по степени окрашивания или по измерению оптической плотности в лунках планшета после добавления стоп-раствора.

Результаты исследований показали высокую чувствительность и специфичность метода с использованием тест-системы серии SureFood, позволяющего проводить идентификацию до 0,1% мяса птицы в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных (таблица 2).

При этом не наблюдалось перекрестных реакций между ДНК, выделенной из курицы, утки, индоутки, а также с ДНК, выделенной из животных других видов.

ДНК-гибридизация со специфическими ДНК-зондами позволяла проводить дифференциацию мяса птицы в смешанных мясных фаршах. Эти данные хорошо согласуются с результатами идентификации свинины с использованием тест-систем данной фирмы (Морозова Е.Н., 2005 г.).

Таблица 2

Идентификация мяса птицы с использованием тест-системы серии SureFood.

Исследуемые образцы	Результаты гибридизации со специфическими ДНК-зондами			
	ДНК-зонд на утку	ДНК-зонд на индоутку	ДНК-зонд на индейку	ДНК-зонд на курицу
Мясо утки сырое	+	-	-	-
Мясо индоутки сырое	-	+	-	+
Мясо индейки сырое	-	-	+	-
Мясо кур сырое	-	-	-	+
Мясо утки вареное	+	-	-	-

Мясо индоутки вареное	-	+	-	-
Мясо индейки вареное	-	-	+	-
Мясо кур вареное	-	-	-	+
Сырая баранина	-	-	-	-
Сырая говядина	-	-	-	-
Сырая свинина	-	-	-	-
Фарш(индюшатина 5%, говядина 95%)	-	-	+	-
Фарш(индюшатина 1%, говядина 99%)	-	-	+	-
Фарш(индюшатина 0,5%,говядина 99,5%)	-	-	+	-
Фарш (индюшатина 0,1 %, говядина 99,9%)	-	-	+	-
Фарш (индюшатина 0, 01 %, говядина 99,99 %)	-	-	-	-
Котлета по-киевски (готовый термообработанный продукт)	-	-	-	+

(+)- положительная реакция, (-)- отрицательная реакция гибридизации

2.2.3. Разработка опытного образца укладки тест-систем и технических средств определения видовой принадлежности мяса

В основу создания опытных образцов укладки легла разработанная нами ранее в ГНУ ВНИИВСГЭ укладка тест-систем технических средств на основе ДНК-гибридизации с изотопномеченными ДНК-зондами.

В результате проведенных исследований был разработан вначале макетный, а затем опытный образец укладки тест-систем и технических средств для определения видовой принадлежности мяса на основе ДНК- и иммунодиагностики, включая возможность постановки реакции ДНК гибридизации с ДНК-зондами, мечеными биотином, реакции иммунодиффузии в геле, а также модифицированной методики, основанной

на включении биотинилированной метки в ДНК-зонды и последующей ДНК-гибридизации.

В состав укладки входят: 1) автоматический дозатор с накопечниками; 2) комплект стандартных фильтров с диаметром пор 0,45 мкм; 3) пробирки с ДНК зондами; 4) флаконы с реагентами тест-систем; 5) чашки Петри; 6) плата для проведения анализа; 7) пинцет; 8) механический гомогенизатор; 9) термостат, работающий от автономного источника питания 12В с температурными режимами реакции гибридизации, денатурации ДНК и фиксации ДНК на фильтры; 10) пассивный холодильник для длительного хранения реагентов и зондов.

Укладка позволяет проводить все операции, связанные с выделением ДНК, денатурацией, иммобилизацией на фильтрах, постановкой самой реакции гибридизации, отмывкой от неспецифической сорбции, реакцией с конъюгатом, субстратом и красителем. Регистрация конечного результата осуществляется визуально путем сравнения интенсивности окрашивания точек с гибридными молекулами на фильтрах с контрольными образцами ДНК.

При проведении исследований по определению видовой принадлежности мяса на основе методики точечной гибридизации образцы мяса и кормов гомогенизировали с помощью механического гомогенизатора, добавляли лизирующий реагент и проводили лизис и очистку ДНК с помощью тест-набора, как описано в методиках. Выделенную ДНК иммобилизовали в виде точек на мембранные нитроцеллюлозные фильтры, фильтры помещали в микрочашки Петри, проводили гибридизацию, отмывку от неспецифической сорбции, реакции с конъюгатом, субстратом и красителем в микротермостате укладки. Оценку конечного результата осуществляли визуально, как описано в методиках. Результаты гибридизации с использованием тест-системы идентификации мяса на основе биотинилированных ДНК-зондов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты идентификации мяса с использованием тест-систем и технических средств укладки

Источник иммобилизованных ДНК	Результаты гибридизации с ДНК-зондами	
	ДНК-зонд на мясо кур	ДНК-зонд на говядину
Мясо кур	++++	-
Баранина	-	-
Свинина	-	-
Говядина	-	++++
Фаршевая смесь говядины, баранины, свинины, мяса кур: 1:1:1:1.	++++	++++
Фаршевая смесь баранины, свинины, мяса кур: 1:1:1.	++++	-
Фаршевая смесь баранины, свинины: 1:1	-	-
Фаршевая смесь говядины, свинины, баранины: 1:1:1	-	++++

(++++) - интенсивность окрашивания точек с гибридными молекулами на уровне положительного контроля.

(-) - интенсивность окрашивания точек с гибридными молекулами на уровне отрицательного контроля сорбции.

При проведении исследования различных мясных продуктов показана возможность выявления говядины и мяса кур с использованием тест-систем на основе ДНК-диагностики и разработанных технических средств в смесях, содержащих мясо других животных. При этом удавалось определять говядину и мясо кур при содержании в фаршевых смесях до 1 %

Кроме того, были проведены испытания методики идентификации мяса методом рассеянной затравки с последующей ДНК-гибридизацией. Из

исследуемого объекта ДНК элюируют с помощью гуанидинизоционата и очищают на колонках Nucleos TM. Далее проводят амплификацию ДНК методом рассеянной затравки в присутствии меченых биотином дезоксинуклеозидтрифосфатов. Меченую амплифицированную ДНК гибридизовали с предварительно полученными в ПЦР и иммобилизованными на фильтрах специфичными «холодными» ДНК-зондами для каждого вида

Экспериментальные исследования показали возможность проведения видовой идентификации с помощью технических средств укладки и тест-системы на основе иммунодиффузии. С этой целью чашки Петри с гелем и фильтрами, пропитанными соответствующими растворами, помещали в модуль ячейки термостата укладки и проводили реакцию, как описано в методике. Результаты исследований представлены в таблице 4

Таблица 4

Результаты идентификации мяса кур на основе иммунодиффузии с использованием тест-систем и технических средств укладки

Исследуемые образцы	Результаты преципитации
Сырое мясо кур	+
Сырая говядина	-
Сырая свинина	-
Сырая баранина	-

(+) - положительная; (-) - отрицательная реакция преципитации

2.2.4 Сравнительный анализ методов идентификации мяса при различных условиях температурной обработки

На следующем этапе был проведен сравнительный анализ различных методов идентификации мяса на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии при различных условиях температурной обработки.

Чувствительность и специфичность методов идентификации мяса, основанных на ДНК-диагностике и иммунодиффузии, зависит от доступности участвующих в реакции молекул и их нативности.

Различные физические и химические воздействия могут приводить к нарушению структур белковых молекул и молекул нуклеиновых кислот.

Известно, например, что термическая обработка мяса приводит к денатурации белковых молекул и утрате ими своих антигенных свойств. Результатом этого является снижение эффективности методов видовой идентификации, основанных на анализе термолабильных белков. Применение в реакции термостабильных белков не всегда дает достаточно специфичные результаты идентификации. Воздействие определенных температур на ДНК приводит к диссоциации двухцепочечной структуры нуклеиновой кислоты, однако, если сохраняется одноцепочечная структура, то этого оказывается достаточно для проведения идентификации на основе ДНК-диагностики.

При дальнейшем разрушении ДНК на отдельные фрагменты, которое может происходить под действием нуклеаз, чувствительность методов идентификации снижается. Вследствие этого методы идентификации, основанные на анализе нуклеиновых кислот, являются более перспективными.

В задачи наших исследований входило изучение воздействия различных физических и химических факторов, возникающих при хранении продукции, на эффективность методов идентификации мяса на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии.

Оценку эффективности анализируемых методов идентификации проводили на образцах мясного сырья, подвергнутых таким воздействиям, как замораживание, размораживание и тепловая обработка.

2.2.4.1 Влияние условий хранения мяса на эффективность методов видовой идентификации на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии.

При транспортировании, хранении, реализации мяса с целью предохранения его от порчи применяют замораживание. Известно, что

кристаллы льда, образующиеся в процессе замораживания, могут привести к деформации и разрушению мышечных волокон, нарушению компартментации молекул белков и нуклеиновых кислот. При размораживании могут наблюдаться потери белков, уменьшение количества влаги и изменения различных физико-химических показателей. Эти процессы также могут послужить денатурирующим фактором для белковых молекул, а также повышение активности протеолитических ферментов и эндонуклеаз, что в конечном итоге сказывается на инактивации антигенов, определяющих видовую принадлежность или на разрушение видоспецифичной ДНК.

В связи с этим в задачи исследований входила оценка влияния процессов замораживания/размораживания на эффективность методов идентификации мяса.

Мясные смеси из первой группы однократно подвергали замораживанию при -20°C , хранили, а затем размораживали в воздушной среде. Мясные смеси из второй группы, замороженные при -20°C , ежедневно в течение 14 суток подвергали размораживанию и повторному замораживанию. Образцы мяса из третьей группы в течение 14 дней хранили в закрытых пробирках при комнатной температуре.

Полученные данные свидетельствовали о том, что диагностические антисыворотки к белкам курицы специфичны и позволяют установить видовую принадлежность мяса кур по результатам реакции иммунодиффузии в фаршевой смеси мясо кур/говядина. Чувствительность реакции составляла 5%. Двухкратная процедура замораживания/размораживания не влияла на чувствительность идентификации мяса кур. Однако, дальнейшие процедуры замораживания/размораживания приводили к снижению чувствительности. Четырнадцатикратная обработка позволяла проводить идентификацию только при содержании в фаршевой смеси 45% мяса кур.

Практически аналогичные результаты были получены при исследовании говядины. Однократная процедура

замораживания/размораживания не сказывалась на чувствительности идентификации мяса кур.

В фаршевой смеси мясо кур/говядина увеличение числа операций по замораживанию/размораживанию до 14 приводило к снижению чувствительности до 40%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что многократная процедура замораживания/размораживания снижает чувствительность методов идентификации мяса кур и говядины на основе иммунодиффузии.

Причиной этого, вероятно, является нарушение антигенных свойств видоспецифичных белков, происходящее в результате вымерзания влаги в тканях и образования крупных кристаллов льда, нарушающих антигенную структуру.

Чувствительность методов идентификации мяса на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией практически мало зависела от многократного замораживания и размораживания фаршевых смесей.

Так, чувствительность идентификации мяса с использованием тест-систем SureFood составляла 0,1-0,5%.

Процент определения мяса с применением технических средств и тест-систем на основе ДНК-гибридизации с биотинилированными зондами на уровне чувствительности методики также мало зависел от процедур замораживания/оттаивания. Процент идентификации на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией снижался только после 11-13 - кратного замораживания/размораживания.

Длительное хранение мяса при комнатной температуре в течение двух недель приводило к полной утрате антигенных свойств и, как следствие, к невозможности определения видовой принадлежности мяса методами иммунодиффузии. Исходя из этого, можно заключить, что процессы, возникающие при порче мяса, оказывают отрицательное воздействие на эффективность методов, основанных на анализе видоспецифичных белков.

Чувствительность методов идентификации мяса на основе ДНК-диагностики после длительного хранения менялась значительно меньше и варьировала в пределах 10 %.

Полученные данные свидетельствуют о том, что методы на основе ДНК-диагностики более пригодны для идентификации мяса при нарушении режимов хранения.

2.4.4.2 Влияние термической обработки мяса на эффективность методов идентификации

Термическая обработка мяса проводится в процессе приготовления мясных изделий. Известно несколько видов термообработки. При изготовлении колбас используются процессы осадки, обжарки, варки, копчения, сушки. При производстве консервных изделий основными видами тепловой обработки являются пастеризация и стерилизация.

Термическая обработка мяса приводит к изменению свойств структурных компонентов клетки. Наибольшим изменениям, как правило, подвергаются белковые молекулы. Нарушение вторичной и третичной структур белковых молекул начинаются уже при нагревании их до 30-50°C. Коагуляция большинства белков происходит в температурном отрезке 70-90°C. При денатурации происходит изменение водородных связей, нарушаются электростатические взаимодействия. В результате изменений происходит утрата белками антигенных свойств, и, вследствие этого, возникают трудности при идентификации термообработанных мясных продуктов иммунологическими методами.

Известно, что ДНК является более термостабильной молекулой, кроме того ее денатурация при нагревании используется при постановке ПЦР. Длительная высокотемпературная обработка (свыше 100°C) может привести к разрушению ДНК – ее деградации, которая заключается в разрушении фосфодиэфирных связей между отдельными дезоксирибонуклеотидами.

Потеря нативности ДНК в определенных пределах может привести к изменению способности к амплификации и гибридизации.

На следующем этапе исследований была проведена оценка влияния различных режимов температурной обработки на эффективность методов определения видовой принадлежности мяса. С этой целью готовили образцы мясных фаршевых смесей, и подвергали их термической обработке от 50 до 120°C, а также осуществляли обработку отдельных мясных фаршей при 120°C под давлением (2 атм.). В качестве контроля использовали необработанные мясные смеси.

Полученные результаты, свидетельствовали о том, что термическая обработка мясных проб оказывает существенное влияние на показатели чувствительности методов видовой идентификации мяса кур и говядины на основе иммунодиффузии.

Непродолжительная обработка мясного сырья при сравнительно невысоких температурах (55-65°C) практически не влияла на показатели чувствительности иммунологических методов. Порог чувствительности реакции иммунодиффузии при идентификации фаршевых мясных смесей, подвергавшихся прогреванию при 55°C в течение одного часа или при 65°C в течение 30 минут, соответствовал чувствительности в контролях.

Повышение температурной экспозиции до двух часов при 55°C или одного часа при 65°C приводило к небольшому снижению антигенной активности видоспецифичных белков, которое выражалось в уменьшении порога чувствительности иммунологических реакций с 5 до 10%. Дальнейшее понижение чувствительности наблюдалось при длительном (2 часа) прогревании мясных фаршей при 65°C.

Увеличение температурной обработки до 75°C приводило к резкому снижению чувствительности иммунологических тестов. При этом удавалось выявить только 35- 40% мяса курицы и говядины соответственно от общей массы фаршевой смеси.

Обработка мясного сырья при 80°C приводила к утрате белками своих антигенных свойств до 80%.

Таким образом, чувствительность методов видовой идентификации мяса на основе иммунодиффузии сильно зависела от режимов температурной обработки.

Методы ДНК-диагностики менее чувствительны к термической обработке.

В результате тепловой обработки мяса в течение двух часов при 80°C и в течение часа при 100°C чувствительность метода на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией и детектированием гибридных молекул по иммуноферментному типу оставалась неизменной и составляла 0,1% мясной примеси анализируемого вида от общей массы мясного фарша.

Более жесткая термическая обработка приводила к снижению порога чувствительности до 0,5-1,0 %

Автоклавирование сильно не препятствовало идентификации с помощью метода на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией и детектированием гибридных молекул по иммуноферментному типу. Чувствительность составляла 2-2,5%.

Аналогичные результаты были получены для методики ДНК-гибридизации с биотинилированными ДНК-зондами. В результате тепловой обработки мяса в течение двух часов при 80°C и в течение часа при 100°C чувствительность этого метода составляла 1% мясной примеси анализируемого вида от общей массы мясного фарша, то есть находилась в пределах чувствительности нативных образцов. Автоклавирование также сильно не влияло на идентификацию с помощью метода ДНК-гибридизации. Чувствительность составляла 2-5%.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что методы ДНК-диагностики более устойчивы к негативному воздействию высоких температур по сравнению с иммунологическими тестами.

Результаты экспериментальных исследований показали возможность применения разработанных нами методов для видовой идентификации изделий из мяса птицы и говядины, прошедших термическую обработку

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.);

- Методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса с помощью тест-систем и технических средств укладки на основе генных зондов, меченных биотином (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии, 09.11.2005 г.);

- Технические условия 9388-004-7703052541-2005 Укладка тест-систем и технических средств определения видовой принадлежности мяса на основе генных зондов меченных биотином (Утверждены ГНУ ВНИИВСГЭ 28.11.2005 г.)

ВЫВОДЫ

1. Проведено совершенствование методов идентификации мяса птицы и говядины с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией и детектированием по иммуноферментному типу, а также на основе иммунодиффузии.

2. Показана высокая чувствительность и специфичность методов на основе амплификации с последующей гибридацией, позволяющих

проводить идентификацию до 0,1% мяса птицы: курицы, утки, индоутки и говядины в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных.

3. Чувствительность и специфичность метода на основе иммунодиффузии позволяет проводить идентификацию до 5% мяса птицы и говядины в сырье и сырых продуктах животного происхождения.

4. Разработаны опытные образцы тест-систем и технических средств в виде укладки для идентификации мяса на основе ДНК-гибридизации, иммунодиффузии и методики амплификации с рассеянной заправкой с последующей ДНК-гибридизацией.

5. Разработана модифицированная методика идентификации мяса птицы и говядины с использованием тест-систем и технических средств на основе ДНК-гибридизации с применением биотинилированных ДНК-зондов.

6. Специфичность метода позволяла проводить идентификацию в фаршевых смесях с чувствительностью до 1%.

7. В результате экспериментальных исследований по влиянию различных способов технологической обработки мясного сырья на показатели чувствительности и специфичности методов идентификации мяса птицы и говядины показали преимущества методов на основе ДНК-диагностики и возможность их использования после размораживания/оттаивания и после термической обработки.

8. Разработаны методические рекомендации по идентификации мяса и мясopодуктов на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии с применением стандартизованных по международным требованиям тест-систем, а также разработанных тест-систем и технических средств укладки.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Светличкин В.В., Писарева В.М., Кононенко А.Б., Кузькин Б.П., Галкин А.В., Морозова Е.Н., 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.

2. Родин В.И., Горобчук Е.А., Светличкин В.В., Кононенко А.Б., Узунян Д.Г., Рощупкина Л.В. / Оценка безопасности и качества продуктов с использованием тест-систем на основе ДНК и иммунодиагностики. // Материалы научно – практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных» Москва, МГУ ПБ, 2006, стр.494-496.

3. Узунян Д.Г. /Идентификация мяса птицы на основе методов ДНК диагностики // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии// Том 118, стр.23-25, 2006 г.

4. Узунян Д.Г. /Изучение влияния различных способов хранения мяса на эффективность методов определения видовой принадлежности// Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии// Том 118, стр. 26-27, 2006 г.

ГНУ ВНИИВСГЭ г. Москва, Звенигородское шоссе, 5

Заказ 202/3 .Тираж 80 экз.

