

Министерство здравоохранения Республики Беларусь  
РЕСПУБЛИКАНСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ»  
(ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «НПЦГ»)

УТВЕРЖДАЮ

Директор республиканского унитарного  
предприятия «Научно-практический  
центр гигиены»  
канд. мед. наук, доцент

С.И. Сычик

« 06 » .07 2017 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНТАМИНАЦИИ ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ ПРОДУКТОВ  
ПТИЦЕВОДСТВА В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ  
(заключительный)

договор № 1084 от 24.02.2017 г.  
с Частное унитарное предприятие «ПАГ-Е-ПАГ»

Заместитель директора по  
научной работе,  
канд. мед. наук, доцент



.07.2017

Л.М. Шевчук

Руководитель НИР

старший научный сотрудник  
лаборатории микробиологии  
канд. биол. наук



.07.2017


О.А. Емельянова

Минск 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель:


старший научный сотрудник  
лаборатории микробиологии  
канд. биол. наук

 05.07.2017

О.А. Емельянова  
(реферат, введение, разделы  
1-2, заключение)

Ответственный исполнитель:

заведующий лабораторией  
микробиологии,  
докт.биол.наук, доцент

 05.07.2017

Н.В.Дудчик  
(реферат, введение, разделы  
1-2, заключение)

## РЕФЕРАТ

Отчет 20 с., 1 ч., 4 табл., 13 источников.

МИКРОБИОЛОГИЯ, ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ, КРАТКОСРОЧНЫЕ ТЕСТЫ, МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ.

Объект исследования – яйца куриные пищевые, искусственно контаминированные бактериями штамма *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Цель работы: изучить в модельном эксперименте продукты птицеводства, контаминированные патогенными бактериями.

Задачи работы:

- провести анализ научной и научно-технической литературы по выявлению в пищевой продукции патогенных микроорганизмов;

- провести в лабораторных условиях контаминацию куриных яиц бактериями рода *Salmonella*;

- выполнить исследование по выявлению бактерий рода *Salmonella* в контаминированных образцах методом ISO 6579:2002 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения сальмонеллы *Salmonella* spp.;

- провести сравнительную оценку результатов исследования по выявлению бактерий рода *Salmonella* в продуктах птицеводства альтернативным методом с использованием Комплекса медицинского спектрально-динамического (КМСД), и результатов исследования, полученных методом ISO 6579:2002.

- подготовить отчет о НИР, содержащий данные о сравнительной оценке эффективности альтернативных экспресс-методов выявления бактерий рода *Salmonella* на базе волновых технологий по сравнению с микробиологическими методами в продуктах птицеводства.

В ходе выполнения работы проведена серия модельных экспериментов по искусственной контаминации яиц куриных бактериями штамма *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, микробиологические исследования контаминированных и контрольных образцов методом ISO 6579:2002 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения сальмонеллы *Salmonella* spp.», и валидация результатов, полученных метода выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием Комплекса медицинского спектрально-динамического (КМСД) с двухэтапным алгоритмом последовательного распознавания.

Полученные результаты показали, что метод выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием Комплекса медицинского спектрально-динамического (КМСД) с

двухэтапным алгоритмом последовательного распознавания имел относительную чувствительность 88,9 %, относительную специфичность –77,8 % и относительную точность – 83,3 % по итогам 3 модельных экспериментов.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	8
1 Материалы и методы.....	8
2 Результаты.....	10
2.1 Результаты микробиологических испытаний.....	10
2.2 Результаты валидации метода выявления бактерий рода <i>Salmonella</i> с использованием КМСД .....	13
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	19
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	20

## Введение

Обеспечение качества продуктов питания является одной из наиболее актуальных проблем современной гигиены. Поэтому обеспечение безопасности и безвредности для человека продуктов питания животного происхождения является одним из основополагающих факторов в комплексе ветеринарных и санитарно-гигиенических мероприятий, направленных на предотвращение инфекционных заболеваний и отравлений, а также сохранение и укрепление здоровья населения.

Большинство стран отмечают существенные увеличения на протяжении последних десятилетий значительной распространенности заболеваний, связанных с содержанием условно-патогенных микроорганизмов в продуктах питания. К числу этих микроорганизмов относятся сальмонеллы, кампилобактерии, энтеропатогенные кишечные палочки. Различные виды патогенных и условно-патогенных микроорганизмов могут явиться причиной пищевого отравления при определенных условиях и массивности дозы. Обладая выраженной биологической и экологической пластичностью, эти микроорганизмы способны к широкому распространению во внешней среде и длительной персистенции в организме человека.

Сальмонеллезы – это инфекционные заболевания, вызываемые многочисленными серотипами бактерий рода *Salmonella*. Они характеризуются разнообразными клиническими проявлениями от бессимптомного носительства и легких форм гастроэнтеритов до тяжелых генерализованных форм болезни, протекающих с резко выраженной интоксикацией и длительной лихорадкой: тифоподобная, септикопиемическая формы. В большинстве случаев заболевание протекает преимущественно с поражением желудочно-кишечного тракта в виде гастроинтестинальных форм: гастрит, гастроэнтерит, гастроэнтероколит [1].

Для большинства зоонозных инфекций, в том числе для сальмонеллеза, первостепенное значение имеет загрязнение сырья интестинальным содержимым при его производственной разделке и обработке. В яйцо патогенные бактерии могут попасть через скорлупу, загрязненную выделениями или трансвариально (от инфицированной птицы к плоду). При этом уровень вторичной контаминации готового продукта находится в прямой зависимости от интенсивности заражения и степени бактерионосительства птиц и животных. Все бактерии рода *Salmonella* длительно сохраняются во внешней среде: в воде до 2-х недель, в мясе и колбасных изделиях до 4-х месяцев, в замороженном мясе до 6 месяцев, в молоке до 20 дней, в сырах – до 1 года [2]. В пищевых продуктах они не только

сохраняют жизнеспособность, но и размножаются. Довольно устойчивы к высоким температурам, при низких температурах сохраняют жизнеспособность более 100 дней, а замораживание увеличивает сроки выживания микроорганизмов в продуктах. При гибели сальмонелл выделяется эндотоксин. По данным FDA частота выделения сальмонелл в США в среднем составляла 5% от общего количества (более 4000) исследованных проб пищевого сырья [3]. Контаминированное куриное мясо идентифицируется как один из основных пищевых источников бактерий рода *Salmonella*. При исследовании более 200 цыплят-бройлеров сальмонеллы были выделены в 23% случаев, при изучении загрязненности куриного мяса-сырья было обнаружено, что более 19% тушек бройлеров обсеменено бактериями рода *Salmonella* [4].

Яйца составляют значительную долю в рационе питания человека. Они служат источником белков, жиров, витаминов и минеральных веществ, имеют высокую пищевую и биологическую ценность и усвояемость, но также они являются одним из значимых факторов передачи сальмонеллез. Скорлупа яиц обсеменена различной микрофлорой чаще, чем внутреннее содержимое, которое обладает выраженной антибактериальной активностью в основном за счет лизоцима. При нарушении температурно-влажностного режима хранения яиц микрофлора с их поверхности проникает внутрь через поры вначале на подскорлупные оболочки, а затем в белок и желток, инактивирует факторы бактерицидности, что приводит к порче яиц [5].

В настоящее время выявление бактерий рода *Salmonella* в продуктах питания осуществляется методами классической микробиологии. Как правило, микробиологическое исследование предусматривает четыре этапа: неселективное и селективное обогащение, выявление и подтверждение. В пищевых продуктах микроорганизмы рода *Salmonella* находятся в смешанной форме с другими микроорганизмами и для их выявления необходимо применение селективных сред обогащения, подавляющих рост сопутствующей микрофлоры. Окончательные результаты с использованием традиционных (классических) методов микробиологических исследований пищевой продукции на наличие сальмонелл могут быть получены минимум через 5 суток. Таким образом, результаты испытаний с использованием традиционных методов контроля, получают только тогда, когда продукция уже реализована, т.е. без своевременного их использования применительно к исследованной партии продукции.

Ключом к решению данной проблемы является применение эффективных экспресс-методов, позволяющих проводить выявление патогенных микроорганизмов в пищевой продукции. Для введения в лабораторную практику данных методов необходимо

выполнить оценку их эффективности по сравнению с принятыми в настоящее время подходами.

## Основная часть

### 1 Материалы и методы

Объектом исследования служили тест-объекты: яйца куриные пищевые, произведенные ОАО «Солигорская птицефабрика», ОАО «Кобринская птицефабрика», ОАО «1-я Минская птицефабрика», ОАО «Агрокомбинат «Дзержинский», искусственно контаминированные бактериями штамма *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Все используемые в исследовании образцы яиц были произведены не позднее 14 дней до дня проведения эксперимента.

Предметом исследования служили аналитические характеристики метода выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием изделия медицинской техники Комплекса медицинского спектрально-динамического (КМСД). КМСД прошел официальные технические, гигиенические и клинические испытания в Республике Беларусь (регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Республики Беларусь № ИМ-7.97068/1511 от 30.11.2015г.) и Российской Федерации (регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения Российской Федерации (Росздравнадзор) № ФСР 2009/04973 от 27.02.2015г.). Принцип работы КМСД основан на фиксации, обработке, распознавании и генерации сигналов малой интенсивности, снимаемых с биологических и небиологических объектов. Диагностика основана на алгоритме распознавания образов медико-биологических объектов сравнения в общей спектрально-динамической структуре волнового поля объекта. Оцифрованный сигнал с блока первичного преобразователя информации, представленный в виде массива данных, подвергается вейвлет-преобразованию. Затем формируется двоичный числовой ряд, в котором двоичный код отражает одно из двух возможных направлений вращения фазовых плоскостей на последовательности частот спектра рабочего диапазона. Распознавание производится путем сравнения числовых рядов (кодов) спектров объекта и медико-биологического объекта сравнения (маркера). Информация о КМСД и его применениях содержится в источниках [6 – 11].

В ходе каждого эксперимента 6 яиц куриных из одной партии подвергали обеззараживающей обработке скорлупы и маркировали. Затем производили контрольные исследования на КМСД. В лаборатории микробиологии половину яиц контаминировали бактериями штамма *S. typhimurium* ATCC 14028 в концентрации  $10^9 - 10^{10}$  КОЕ/мл с помощью шприца. Вторая половина яиц выступала в качестве отрицательного контроля,



под скорлупу яиц вносили 1 мл стерильного физиологического раствора (концентрация NaCl 0,89%). Все 6 яиц инкубировали от 1,5 до 24 часов, после чего производили повторное исследование на КМСД слепым методом. Затем все яйца высевали в питательные среды культуральным микробиологическим методом. По истечении 5 дней, требуемых для проведения микробиологического испытания, производили оценку результатов, полученных путем выполнения исследований на КМСД и классическим микробиологическим методом.

Микробиологическое исследование контаминированных и контрольных образцов проводили методом ISO 6579:2002 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения сальмонеллы *Salmonella* spp.» [12, 13].

Определяли массу жидкого содержимого исследуемого яйца и разбавляли его забуференной пептонной водой в соотношении 1:10. Полученную суспензию инкубировали при температуре  $(37\pm 1)$  °C в течение  $(18\pm 2)$  ч. По окончании времени инкубирования по  $1\text{ см}^3$  пересевали в  $10\text{ см}^3$  RVS-бульона и в  $10\text{ см}^3$  селенитовой среды. Посевы на RVS-бульоне инкубировали при температуре  $(41,5\pm 1,0)$  °C в течение  $(24\pm 3)$  ч, а на селенитовой среде – при температуре  $(37\pm 1)$  °C в течение  $(24\pm 3)$  ч. Через 24 ч инкубирования на селективных средах посевы пересевали штрихом на плотные питательные среды: XLD-агар и висмут-сульфит агар. Чашки переворачивали вверх дном и помещали в термостат на  $(24\pm 3)$  ч при температуре  $(37\pm 1)$  °C. На XLD-агаре отмечали наличие либо отсутствие типичных колоний бактерий рода *Salmonella*, которые имеют черный центр и слегка прозрачную зону красноватого цвета. На висмут-сульфит агаре бактерии рода *Salmonella* образуют черные колонии с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и с пигментированием среды под колониями. Отсутствие в посевах на селективно-диагностических средах типичных колоний для бактерий рода *Salmonella* свидетельствовало об отсутствии бактерий рода *Salmonella* в анализируемой навеске (объеме) продукта.

При наличии хотя бы на одной селективно-диагностической среде типичных или не совсем типичных колоний для бактерий рода *Salmonella* проводили их дальнейшую идентификацию. Для идентификации брали с каждой чашки каждой селективной среды от одной до пяти колоний, переносили на поверхность мясо-пептонного агара и инкубировали при температуре  $(37\pm 1)$  °C в течение  $(24\pm 3)$  ч. Полученные чистые культуры подвергали идентификации.

У отобранных и предварительно пересейанных грамотрицательных культур изучали характер роста агаре Клиглера. Бактерии помещали в агар путем уколам в

столбик и инкубировали при температуре  $(37\pm 1)$  °С в течение  $(24\pm 3)$  ч. Наличие бактерий рода *Salmonella* отмечали по почернению столбика и пожелтению скошенной поверхности агара Клигlera, что свидетельствовало об образовании сероводорода и ферментации лактозы соответственно.

Дополнительную идентификацию видовой принадлежности микроорганизмов с помощью анализатора VITEK 2 compact (bioMérieux). Для этого изолированную колонию микроорганизма, видовой принадлежности которого требует идентификации, петлей пересекали на скошенный триптон-соевый агар и инкубировали 16-18 часов при температуре  $(37\pm 1)$  °С. По окончании времени инкубации определяли Грам-принадлежность анализируемой бактерии. С помощью автоматических пипеток с фиксированным объемом и дозатора жидкости, входящих в комплект к анализатору, готовили суспензию микроорганизма в 3 мл солевого раствора с оптической плотностью 0,5–0,63 по шкале МакФарланда. В зависимости от Грам-принадлежности исследуемого микроорганизма выбирали карту для идентификации, распаковывали ее и помещали заправочную трубочку карты в пробирку с суспензией бактерий. Пробирки с суспензией и соответствующие карты устанавливали на кассету, которую в свою очередь помещали в вакуумную камеру прибора. После заполнения кассеты переносили ее в камеру инкубации-считывания. В компьютерную программу анализатора вводили информацию об исследуемом образце. Результаты эксперимента учитывали через 16-20 часов.

Оценку аналитических характеристик метода выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием КМСД проводили в соответствии с СТБ П ИСО 16140-2003/2010 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов» [8].

## 2 Результаты

### 2.1 Результаты микробиологических испытаний

Результаты микробиологических исследований по выявлению бактерий рода *Salmonella* в контаминированных и контрольных образцах, полученные методом ISO 6579:2002 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения сальмонеллы *Salmonella* spp.», представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследования яиц куриных в модельном эксперименте

№ эксперимента	Дата проведения	Образец	Бактерии рода <i>Salmonella</i>
1	10.03.2017 г.	1 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		2 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		3 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		4 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		5 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		6 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
2	15.03.2017 г.	1 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		2 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		4 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		5 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		6 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
3	23.03.2017 г.	1 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		2 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		4 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		5 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		6 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
4	29.03.2017 г.	1 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		2 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		4 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		5 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		6 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
5	13.04.2017 г.	1 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		2 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		3 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		4 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		5 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		6 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены

Продолжение таблицы 1			
6	27.04.2017 г.	1 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		2 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		4 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		5 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		6 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
7	18.05.2017 г.	1 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		2 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		4 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		5 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		6 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
8	31.05.2017 г.	1 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		2 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		4 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		5 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		6 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
9	12.06.2017 г.	1 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		2 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		3 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		4 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены
		5 – контрольный образец (физ. р-р)	не обнаружены
		6 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	обнаружены

Как видно из таблицы 1, во всех исследованных контаминированных образцах были выявлены бактерии рода *Salmonella*. На XLD-агаре и висмут-сульфит агаре выявлялись характерные черные, а также зеленоватые колонии.

В эксперименте № 2 визуализация результатов была затруднена из-за наличия ползучего роста бактерий рода *Protheus*. В эксперименте № 8 в контрольных образцах отмечалось наличие посторонней микрофлоры, идентифицированной с помощью анализатора VITEK 2 compact как *Enterobacter spp.*

2.2 Результаты валидации метода выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием КМСД

На основании проведенных испытаний с использованием КМСД были определены наиболее наглядные условия модельного эксперимента и оптимальные режимы выполнения измерений (2-ух этапный алгоритм последовательного распознавания.). Для последующей валидации были отобраны результаты экспериментов от 27.04.2017 г., 18.05.2017 г. и 31.05.2017 г. (концентрация бактерий на образец –  $10^{10}$  КОЕ/мл, время инкубации контаминированных и контрольных образцов – 24 часа при температуре (37±1) °С).

Была проведена оценка эффективности выявления бактерий рода *Salmonella* с помощью маркеров «Сальмонелла» и «*Salmonella typhi* 481» (1 этап диагностики). Результаты, полученные с использованием КМСД, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследования яиц куриных с помощью маркеров «Сальмонелла» и «*Salmonella typhi* 481»

Дата проведения эксперимента	Образец	Маркер «Сальмонелла»	Маркер « <i>Salmonella typhi</i> 481»	Результат: наличие <i>Salmonella</i>
27.04.2017 г.	1 – контрольный образец (физ. р-р)	-	-	нет
	2 – контрольный образец (физ. р-р)	+	-	да/нет
27.04.2017 г.	3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	+	+	да
	4 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	+	+	да
	5 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	+	+	да
	6 – контрольный образец (физ. р-р)	-	-	нет
18.05.2017	1 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	-	+	да/нет
	2 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	+	+	да
	3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	+	+	да
	4 – контрольный образец (физ. р-р)	-	-	нет
	5 – контрольный образец (физ. р-р)	+	+	да
	6 – контрольный образец (физ. р-р)	+	-	да/нет

Продолжение таблицы 2				
31.05.2017	1 – контрольный образец (физ. р-р)	-	-	нет
	2 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	-	-	нет
	3 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	+	-	да/нет
	4 – контрольный образец (физ. р-р)	-	-	нет
	5 – контаминирован <i>S. typhimurium</i>	+	+	да
	6 – контрольный образец (физ. р-р)	-	+	да/нет

Как видно из представленных в таблице 2 данных, только в 13 случаях из 18, проанализированных с использованием маркеров «Сальмонелла» и «*Salmonella typhi* 481», был получен окончательный результат, не требующий уточнения. При этом из 9 контаминированных образцов 6 были распознаны верно, а для 1 был получен ложноотрицательный результат. Из 9 контрольных образцов в 5 было установлено отсутствие бактерий рода *Salmonella*, а для 1 – получен ложноположительный результат. Еще в 5 образцах (2 контаминированных и 3 контрольных) результаты маркеров «Сальмонелла» и «*Salmonella typhi* 481» не совпали (+/-), что не позволяло судить о присутствии в яйце искомого штамма микроорганизма. Для этих образцов был использован дополнительный набор из 7 маркеров: «*Salmonella typhi* 9157», «Holera», «Сыпной тиф», «Бактерия Гартнера», «Сальмонелла паратифа D32», «*Salmonella typhi* 1475», «Сальмонелла брюшного тифа». Полученные результаты представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, для всех 5 образцов, проанализированных во втором этапе, были получены однозначные результаты. Контаминированные образцы были распознаны как содержащие бактерии рода *Salmonella*, в контрольных – 1 образец ошибочно диагностирован как положительный.

Валидацию метода выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием КМСД проводили в соответствии с СТБ П ИСО 16140-2003/2010. За эталонный метод был принят стандарт ISO 6579:2002 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения сальмонеллы *Salmonella* spp.».

В результате проведенных исследований были определены следующие аналитические характеристики метода:

- относительная точность;
- относительная чувствительность;

- относительная специфичность.

- Относительная точность (AC): степень соответствия между реакцией, полученной в результате применения эталонного метода, и реакцией, полученной в результате применения альтернативного метода на идентичных образцах. В качестве принятого опорного значения выбрано значение, получаемое эталонным методом. Относительная точность рассчитывается по Формуле 1.

- Положительное отклонение (PD): альтернативный метод «ложноположителен», когда он показывает положительное отклонение (т.е. получен положительный результат), в то время как эталонный метод дает отрицательный результат. Положительное отклонение становится ложноположительным результатом, когда можно доказать, что истинный результат отрицателен. Положительное отклонение считается «истинно положительным», когда можно доказать, что истинный результат положителен.

- Отрицательное отклонение (ND): альтернативный метод показывает отрицательное отклонение (т.е. получен отрицательный результат), в то время как эталонный метод дает положительный результат. Отрицательное отклонение считается «ложноотрицательным», когда можно доказать, что истинный результат положителен.

- Относительная чувствительность (SE): способность альтернативного метода выявлять анализируемый образец, если он выявляется путем применения эталонного метода. Относительная чувствительность рассчитывается по Формуле 2.





- Относительная специфичность (SP): способность альтернативного метода не выявлять анализируемый образец, если он не выявляется путем применения эталонного метода. Относительная специфичность рассчитывается по Формуле 3.

Относительная точность

(1)

Относительная чувствительность:

$$SE = \frac{PA}{N+} \times 100\%$$

(2)

Относительная специфичность

$$SP = \frac{NA}{N-} \times 100\%$$

(3)

где N – общее количество образцов (NA + PA + PD + ND);

PD – положительное отклонение;

ND – отрицательное отклонение;

NA – отрицательное соответствие;

PA – положительное с соответствие;

N- – общее количество отрицательных результатов, полученных путем использования эталонного метода (NA + PD);

N+ – суммарное число положительных результатов, полученных путем использования эталонного метода (PA + ND).

Результаты валидации метода выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием КМСД с двухэтапным алгоритмом последовательного распознавания представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты исследования яиц куриных с использованием эталонного (ISO 6579) и альтернативного методов (с использованием КМСД).

Группы продуктов	Реакция	Эталонный метод, положительный (R+)	Эталонный метод, отрицательный (R-)
Яйца куриные (контаминированные образцы и контрольные образцы)	Альтернативный метод, положительный (A+)	+/+ положительное соответствие PA=8	-/+ положительное отклонение PD=2
	Альтернативный метод, отрицательный (A-)	+/- отрицательное отклонение ND=1	-/- отрицательное соответствие NA=7

Как видно из результатов, представленных в таблице 4, а также согласно расчетам, проведенным по формулам 1–3, для метода выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием КМСД с двухэтапным алгоритмом последовательного распознавания относительная чувствительность составила 88,9 %, относительная специфичность –77,8 %, а относительная точность – 83,3 % по итогам 3 модельных экспериментов.

## Заключение

Обеспечение микробиологической безопасности пищевых продуктов является одной из приоритетных задач, решение которой непосредственно направлено на охрану здоровья населения. Разработка и совершенствование методов выявления патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах позволит сократить время выполнения анализа, снизить его стоимость и повысить достоверность получаемых результатов. Важным этапом создания новых методов выявления патогенов в продуктах питания является их валидация. Практической ценностью валидации является то, что в процессе разработки новых, альтернативных методов можно своевременно выявить их недостатки и на ранних стадиях существенно улучшить методику проведения испытания. Кроме того, валидация метода является подтверждением правильности выбора методики испытания, гарантирующее получение ожидаемых и воспроизводимых результатов, соответствующих поставленной цели.

В ходе выполнения работы проведена серия модельных экспериментов по искусственной контаминации яиц куриных бактериями штамма *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, микробиологические исследования контаминированных и контрольных образцов методом ISO 6579:2002 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения сальмонеллы *Salmonella* spp.», и валидация результатов, полученных методом выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием Комплекса медицинского спектрально-динамического (КМСД) с двухэтапным алгоритмом последовательного распознавания.

Полученные результаты показали, что метод выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием Комплекса медицинского спектрально-динамического (КМСД) с двухэтапным алгоритмом последовательного распознавания имел относительную чувствительность 88,9 %, относительную специфичность –77,8 % и относительную точность – 83,3 % по итогам 3 модельных экспериментов.

#### Список использованных источников

- 1 Богуцкий, М. И. Сальмонеллезная инфекция / М. И. Богуцкий // Журнал ГрГМУ. – 2011. – №1 (33). – С.7–11.
- 2 Сальмонеллезная инфекция [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://meddoc.com.ua/salmonelleznaya-infekciya/> . - Дата доступа: 19.04.2017.
- 3 Ефимочкина, Н. Р. Эмерджентные бактериальные патогены в пищевой микробиологии / Н. Р. Ефимочкина. - М.: Издательство РАМН, 2008 - 256 с.
- 4 О санитарно-эпидемической обстановке в Республике Беларусь в 2012 году : гос. доклад. – Минск, 2013.
- 5 Чубенко, Н. В. Микробиологический контроль за качеством и безопасностью пищевой продукции / Н.В. Чубенко, Л. А. Малышева, И. В. Капелист // Ветеринарная Патология. – 2010. – №4. – С. 92–96.
- 6 Комплекс медицинский спектрально-динамический [Электронный ресурс]/Режим доступа: <http://www.kmsd.su>. – Дата доступа: 09.09.2009.
- 7 Комплекс медицинский спектрально-динамический [Электронный ресурс]/Режим доступа: [www.kmsd.by](http://www.kmsd.by). - Дата доступа: 09.09.2009.
- 8 Ростовцев В.Н. Спектральная динамика и физиология /В.Н. Ростовцев, В.С. Улащик. //Новости медико–биологических наук. Научно–практический и научно–теоретический журнал. – 2009. – №4. – С. 129–133.
- 9 Ростовцев В.Н. Новая технология волновой медицины /В.Н. Ростовцев // «Межэлектроника-2012» Средства медицинской электроники и новые медицинские технологии: сб. науч. ст. VII межд. науч.-технич. конф., Минск, 13-14 декабря 2012 г. – Минск: БГУИР, 2012. – С. 257-258.
- 10 Ростовцев В.Н. Технология экспресс-диагностики на основе спектрально-динамического метода. /В.Н.Ростовцев //Здравоохранение.-2014.-№4. С.47-50.
- 11 Ростовцев В.Н. Решение проблемы ранней диагностики/ В.Н. Ростовцев //Справочник врача общей практики (СВОП). №4-2016.- С.10-15.
- 12 ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp. // Geneva, Switzerland: International Organization for Standartization, 2002.
- 13 СТБ П ИСО 16140-2003/2010 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов».

**ИСПОЛНИТЕЛЬ:**

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены». 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8. Расчетный счет № 3012018040011 в филиале № 529 «Белсвязь» ОАО «АСБ Беларусбанк» г. Минска, МФО 153001720, пр-т Независимости, 56. УНП 101002035, ОКПО 020176315000.

**ЗАКАЗЧИК:**

Частное унитарное предприятие «ПАГ-Е-ПАГ». 220040, г. Минск, 2-й пер. Можайского, д. 34. Расчетный счет № 3012034002341 в АСБ «Беларусбанк», филиал № 514, 47А, ул. Сурганова, г. Минск, код 153001614, УНП 191069529, ОКПО 378256525000

**АКТ № 1084**

Сдачи-приемки выполненных работ по договору № 1084 от «24» «02» 2017 составлен «06» «07» 2017 г.

Описание работ: Исследование контаминации патогенными бактериями продуктов птицеводства в модельном эксперименте.

Основание для проведения работ: Заявление Исх: от 05.01.2017 г. № 1-1-17, Вх: от 19.01.2017 г. № 297.

Мы, нижеподписавшиеся, представитель ИСПОЛНИТЕЛЯ, заместитель директора по научной работе республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены» Шевчук Л.М., с одной стороны, и представитель ЗАКАЗЧИКА директор Частного унитарного предприятия «ПАГ-Е-ПАГ» Дунай Д.М., с другой стороны, составили настоящий акт в том, что выполненная работа удовлетворяет условиям договора, надлежащим образом и порядке оформлена.

ЗАКАЗЧИК к качеству и объему выполненных работ претензий не имеет.

Стоимость работ по договору составляет 1000 руб. 04 копейки (Тысяча) рублей 04 коп. ВУН, в том числе НДС по ставке 20% 166 руб. 67 коп. (Сто шестьдесят шесть) руб. 67 коп. ВУН.

**ИСПОЛНИТЕЛЬ**

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены». 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8. Расчетный счет № 3012018040011 в филиале № 529 «Белсвязь» ОАО «АСБ Беларусбанк» г. Минска, МФО 153001720, пр-т Независимости, 56. УНП 101002035, ОКПО 020176315000.

**ЗАКАЗЧИК**

Частное унитарное предприятие «ПАГ-Е-ПАГ». 220040, г. Минск, 2-й пер. Можайского, д. 34. Расчетный счет № 3012034002341 в АСБ «Беларусбанк», филиал № 514, 47А, ул. Сурганова, г. Минск, код 153001614, УНП 191069529, ОКПО 378256525000

Заместитель директора по научной работе республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены»

Директор Частного унитарного предприятия «ПАГ-Е-ПАГ»

  
Л.М. Шевчук  
«    »    2017 г.  
М.П.



  
Д.М. Дунай  
«    »    2017 г.  
М.П.

