

- nikov V.A. *Methods for Assessing Individual Typological Features of the Physical Development of the Person: Textbook [Metody otsenki individual'no-tipologicheskikh osobennostey fizicheskogo razvitiya cheloveka: Uchebno-metodicheskoe posobie]*. Krasnoyarsk: KrasGMA; 2005. (in Russian)
13. Kuchma V.R., Tkachuk E.A., Efimova N.V. Hygienic estimation of an intensification of educational activities of children in modern conditions. *Voprosy shkol'noy i universitetskoj meditsiny i zdorov'ya*. 2015; (1): 4–11. (in Russian)
 14. Kuchma V.R., Milushkina O.Yu., Bokareva N.A., Skoblina N.A. Modern trends of preventive work in educational institutions. *Gigiena i sanitariya*. 2014; 93(6): 107–11. (in Russian)
 15. Baranov A.A., Kuchma V.R., eds. *Methods of Study of the Physical Development of Children and Adolescents in Population Monitoring: a Guide for Physicians [Metody issledovaniya fizicheskogo razvitiya detey i podrostkov v populyatsionnom monitoringe. Rukovodstvo dlya vrachej]*. Moscow; Soyuz pediatrov Rossii; 1999. (in Russian)
 16. Dorokhov R.N., Petrukhin V.G. *Medico-pedagogical Aspects of Training Young Athletes [Mediko-pedagogicheskie aspekty podgotovki yunyh sportsmenov]*. Smolensk: SGIFK; 1989. (in Russian)
 17. Rebrova O.Yu. *Statistical Analysis of Medical Data. Application Software Package STATISTICA [Statisticheskij analiz meditsinskikh danykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA]*. Moscow: MediaSfera; 2002. (in Russian)

Поступила 09.03.16
Принята к печати 13.05.16

Гигиена питания

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 614.31:639.2]-078

Сыромятников М.Ю., Кокина А.В., Механтьев И.И., Попов В.Н.

ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЯСА ЛОСОСЯ БАКТЕРИЯМИ ГРУППЫ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БАРКОДИНГА ДНК ПРОДУКТОВ ЯПОНСКОЙ КУХНИ

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Минобрнауки РФ, 394006, Воронеж

Метод баркодинга ДНК как инструмент генетической паспортизации и идентификации таксономической принадлежности организмов появился сравнительно недавно. Нами был применен метод баркодинга ДНК для таксономической идентификации рыбных ингредиентов (лосось, тунец, летучая рыба, акула) в продуктах японской кухни. Были проанализированы 27 образцов из 6 точек розничной торговли и 3 ресторанов в Воронеже. В качестве «лосося» все выбранные коммерческие компании использовали филе атлантического лосося или семги (*Salmo salar*), который считается менее ценным, чем тихоокеанский лосось. Результаты баркодинга ДНК показали, что один из образцов «лосося» заменен на желтоперого тунца. Также один образец «тунца» был заменен на филе атлантического лосося. При анализе «икры летучей рыбы» только один образец соответствовал искомой ДНК, а именно ласточкокрылу обыкновенному (*Hirundichthys affinis*). В остальных образцах была идентифицирована ДНК мойвы (*Mallotus villosus*). При анализе образца «акула» была идентифицирована ДНК мозамбикской тляции, которая является пресноводной рыбой. При анализе «двоичных» сиквентов нами было показано, что в двух образцах «икры летучей рыбы» была смесь икры ласточкокрыла обыкновенного и мойвы. Примечательно, что в одном из образцов «лосось» на основе баркодинга ДНК была идентифицирована бактерия *Pseudomonas fluorescens*. Анализ «двоичных» сиквентов образцов «лосось» также показал примесь ДНК этой бактерии. При последующем анализе мяса лосося с использованием видоспецифичных праймеров к этой бактерии она была идентифицирована во всех образцах. *P. fluorescens* вызывает заболевание у лососевых рыб и может быть опасной для людей с низким уровнем иммунитета. Показано, что праймеры, используемые для баркодинга ДНК, имеют высокую степень гомологии с ДНК бактерий группы *P. fluorescens*.

Ключевые слова: баркодирование ДНК; цитохромоксидаза; рыбный ингредиент; идентификация; *Pseudomonas fluorescens*; загрязнение.

Для цитирования: Сыромятников М.Ю., Кокина А.В., Механтьев И.И., Попов В.Н. Выявление загрязнения мяса лосося бактериями группы *Pseudomonas fluorescens* при проведении баркодинга ДНК продуктов японской кухни. *Гигиена и санитария*. 2017; 96(5): 483–488. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-5-483-488>

Syromyatnikov M.Yu., Kokina A.V., Mehantev I.I., Popov V.N.

IDENTIFICATION OF CONTAMINATION OF SALMON MEAT BY DNA FROM BACTERIA OF THE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* GROUP IN THE IMPLEMENTATION OF THE DNA BARCODING OF PRODUCTS OF JAPANESE CUISINE

Voronezh State University, Voronezh, 394006, Russian Federation

DNA barcoding as a tool for genetic certification and identification of taxonomic membership of organisms has recently become very popular. We have applied DNA barcoding method for taxonomic identification of fish ingredients (salmon, tuna, flying fish roe, shark) in product of Japanese cuisine. We have analyzed 27 samples from 6 retail outlets and 3 restaurants of the city of Voronezh. It was found that for products designated as containing “salmon” in all selected outlets were used as a fillet of Atlantic salmon (*Salmo salar*), which is considerably less valuable than Pacific salmon. Results of DNA barcoding showed that one of the samples of «salmon» was in fact, yellowfin tuna, whereas one sample of “tuna” was a fillet of Atlantic salmon. However in general, the “salmon” and “tuna” samples were substituted infrequently. Analysis of “flying fish roe” samples revealed that only one sample from 6 was really Four-wing flyingfish (*Hirundichthys affinis*). The remaining samples were identified as DNA of capelin (*Mallotus villosus*).

By analyzing the “double” sequences in 2 samples, we have found that two samples of «flying fish roe» were mixtures of Fourwing flyingfish roe and capelin roe. A sample labeled “shark” was identified as Mozambique tilapia. This species is a freshwater fish. Bacterium *Pseudomonas fluorescens* was identified in one of the “salmon” samples. Analysis of “double” sequences of “salmon” samples revealed presence of *P. fluorescens* DNA. Analysis of salmon meat with the use of species-specific primers for this bacterium revealed contamination of all samples by *P. fluorescens*. This bacterium causes the disease in salmon and can be harmful to patients with compromised immune systems. Primers used for DNA barcoding were shown to have high homology to DNA of bacterial group *P. fluorescens*.

Keywords: DNA barcoding; cytochrome oxidase; fish ingredients; identification; *Pseudomonas fluorescens*; contamination.

For citation: Syromyatnikov M.Yu., Kokina A.V., Mehantev I.I., Popov V.N. Identification of contamination of salmon meat by DNA from bacteria of the *Pseudomonas fluorescens* group in the implementation of the DNA barcoding of products of Japanese cuisine. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2017; 96(5): 483-488. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-5-483-488>

For correspondence: Mikhail Yu. Syromyatnikov, Ph.D., teacher of department genetics, cytology and bioengineering of the Voronezh State University, Voronezh, 394006, Russian Federation. E-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru

Information about authors: Syromyatnikov M.Yu., orcid.org/0000-0001-9028-0613; Kokina A.V., orcid.org/0000-0001-5317-6681; Popov V.N., orcid.org/0000-0003-1294-8686

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: 21 June 2016

Accepted: 04 October 2016

Введение

Метод баркодирования ДНК набирает всё большую популярность как инструмент идентификации таксономической принадлежности организмов [1–3]. Его суть заключается в амплификации и последующем секвенировании участка гена и сравнении полученной последовательности с уже имеющимися в базах данных, таких как Boldsystem и GenBank. В качестве такого гена чаще всего используют митохондриальный ген субъединицы I цитохромоксидазы для животных [4], ядерный ген внутреннего транскрибирующего спейсера (ITS) для грибов [5], а также гены *rbclb* и *matK* для растений [6]. Несмотря на то что баркодирование ДНК широко распространено для оценки биоразнообразия и экологических исследований, метод всё чаще используется для идентификации пищевых субстратов [7, 8]. Кроме того, метод работает даже при высокой степени деградации биоматериала [9].

Замена дорогих рыбных продуктов на более дешёвые аналоги широко распространённое явление [10, 11]. Объясняется это тем, что определить видовую принадлежность рыбного продукта на основе морфологического анализа по филе практически невозможно. В России не проводилась оценка правильности маркировки товаров с рыбными ингредиентами в пунктах реализации японских деликатесов. Между тем идентификация биоматериала, которым заменили исходный рыбный продукт, может иметь значение для здоровья человека. Так, к примеру, эсколар или масляная рыба – продукт, филе которого сходно с филе тунца, может вызвать проблемы с пищеварительной системой человека из-за присутствия большого количества гемпилотоксина [12]. Некоторые виды рыб, такие, например, как хек, способны вызывать сильные аллергические реакции [13]. Зачастую бактерии, которые патогенны для человека, могут быть ассоциированы с таксономической принадлежностью рыбы [14]. Поэтому знание видовой принадлежности рыбного филе является важным в охране здоровья и гигиене питания человека. Исходя из этого, целью нашей работы явилось выявление замен рыбных ингредиентов в точках розничной торговли и ресторанах Воронежа.

Материал и методы

Пробы для анализа были взяты в период с 1 по 4 февраля 2015 г. из 9 точек реализации японской кухни (6 точек розничной торговли и 3 ресторана) Воронежа. В качестве блюда были взяты классические японские деликатесы – суши и роллы. Нами было отобрано 3 образца рыбных ингредиентов для анализа: филе лосося, филе тунца и икра летучей рыбы, или тобики, как компоненты, которые могут быть заменены на более дешёвые аналоги.

Для корреспонденции: Сыромятников Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, преподаватель каф. генетики, цитологии и биоинженерии, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Минобрнауки РФ, 394006, Воронеж. E-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru

Также в одной из крупных сетей были взяты на анализ роллы с акулой. Пробы отбирали с помощью стерильных инструментов с использованием стерильной посуды. Далее проводили взятия точечных проб из разных мест рыбного филе либо икры, после чего смешивали материал непосредственно для молекулярно-генетических исследований. Количество образца, используемого для анализа ДНК, составило от 20 до 100 мкг.

После отбора пробы до анализа хранились при температуре –20°C. ДНК была экстрагирована с помощью коммерчески доступного набора Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research, США). Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Hitachi F-7000. О степени чистоты полученных препаратов судили по соотношению A260/A280.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием Taq-полимеразы на приборе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия). Смешивали в пробирке 0,25 мл следующие компоненты: 10X реакционный буфер 2,5 мкл; 10 mM dNTP 1 мкл; 10 мкмоль праймер 1 мкл; 10 мкмоль обратный праймер 1 мкл; 25 mM Mg2 ± 3 мкл; матрица 1 мкг; термостабильная Taq-полимераза 2,5 ед.; деионизованная вода до 25 мкл. Использовали следующие температурные циклы: 94 °C 3 мин, 35 °C циклов 94 °C 30 с, 51 °C 30 с, 72 °C 45 с, конечная элонгация 72 °C 10 мин. В качестве праймеров использовали следующие: прямой Fish F2 t1 CAACCAACCACAAGACATTGGCAC; обратный № 1 Fish R2 t1 ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA, обратный № 2 FR1d t1 CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAAYCARAA.

Рестриктицию проводили по следующей схеме: брали 10 мкл продукта ПЦР, добавляли 1,5 мкл 10X реакционного буфера и 10 ед. рестриктазы (СибЭнзим, Россия). Объем доводили до 15 мкл деионизированной водой. Инкубировали смесь в течение 2 ч при 37 °C, фермент инактивировали нагревом до 65 °C в течение 20 мин.

Визуализацию продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с последующей визуализацией на трансиллюминаторе TCP-20LM при длине волны 312 нм.

Извлечение ампликона из агарозного геля проводили с помощью коммерчески доступного набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Секвенирование очищенных продуктов ПЦР проводили по методу Сенгера [15] на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3730 с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Полученную после секвенирования последовательность анализировали на предмет сходства нуклеотидной последовательности с уже имеющимися в системе Genbank с помощью биоинформатического инструмента Nucleotide BLAST. Также проводили анализ с помощью международной системы баркодирования Boldsystem. Те последовательности, при анализе результатов которых наблюдалось различие в системах Blast и Boldsystem, подвергали анализу с помощью программы MegaB (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). С помощью этого же

Результаты соответствия последовательностей нуклеотидов гена субъединицы 1 цитохромоксидазы исследуемых рыбных ингредиентов в системах BLAST и BoldSystem

Номер в системе GenBank	Место отбора проб	Заявлено	Идентификация в системе BLAST	Идентичность с BLAST*, %	Идентификация в системе Boldsystem	Идентичность с BoldSystem*, %	Консенсус на основе инструмента Mega6
KT719275	п.р.т. № 1	Лосось	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (бактерии)	99	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (бактерии)	99,8	–
KT719276	п.р.т. № 2	"	<i>Salmo salar</i> (атлантический лосось)	100	<i>Salmo salar</i> (атлантический лосось)	100	–
KT719277	п.р.т. № 3	"	То же	100	То же	100	–
KT719278	п.р.т. № 4	"	" "	100	" "	100	–
KT719279	ресторан № 1	"	" "	100	" "	100	–
KT719280	п.р.т. № 5	"	" "	100	" "	100	–
KT719281	п.р.т. № 6	"	" "	100	" "	100	–
KT719293	ресторан № 3	"	<i>Thunnus albacares</i> (тунец желтоперый)	99	<i>Thunnus albacares</i> (тунец желтоперый)	99,8	–
KT719283	п.р.т. 2	Акула	<i>Oreochromis mossambicus</i> (мозамбикская тиляпия)	99	<i>Oreochromis mossambicus</i> (мозамбикская тиляпия)	99,6	–
KT719282	п.р.т. № 3	Тунец	<i>Salmo salar</i> (атлантический лосось)	100	<i>Salmo salar</i> (атлантический лосось)	100	–
KT719285	ресторан № 2	"	<i>Thunnus albacares</i> (тунец желтоперый)	99	<i>Thunnus obesus</i> (тунец большеглазый)	100	<i>Thunnus obesus</i> (ту- нец большеглазый)
KT719286	п.р.т. № 5	"	То же	100	<i>Thunnus albacares</i> (тунец желтоперый)	100	–
KT719287	п.р.т. № 2	"	" "	100	То же	100	–
KT719288	ресторан № 3	"	" "	98	" "	99,4	–
KT719289	п.р.т. № 1	"	" "	100	" "	100	–
KT719290	ресторан № 1	"	" "	100	" "	100	–
KT719291	п.р.т. № 4	"	" "	100	" "	100	–
KT719292	п.р.т. № 6	"	" "	100	" "	100	–
KT719284	п.р.т. № 4	ИЛР	<i>Hirundichthys affinis</i> (ласточкокрыл обыкновенный)	99	<i>Hirundichthys oxycephalus</i> (ласточкокрыл малоголовый)	99,7	<i>Hirundichthys af- finis</i> (ласточкокрыл обыкновенный)
KT719294	п.р.т. № 5	ИЛР	<i>Mallotus villosus</i> (мойва)	100	<i>Mallotus villosus</i> (мойва)	100	–
KT719295	п.р.т. № 2	ИЛР	То же	99	То же	100	–
KT719296	ресторан № 2	ИЛР	" "	99	" "	99,8	–
KT719297	ресторан № 1	ИЛР	" "	99	" "	100	–

Примечание. п.р.т. – пункт розничной торговли; ИЛР – икра летучей рыбы. * Под идентичностью понимают процент сходства полученной нуклеотидной последовательности с максимально сходной последовательностью в информационных системах BLAST и Boldsystem.

инструмента осуществляли определение генетической дистанции между анализируемыми пищевыми ингредиентами путем измерения K2P (Kimura-2-parameter).

Результаты и обсуждение

Нами были отобраны 4 рыбных ингредиента для анализа: филе лосося, филе тунца и икра летучей рыбы, или тобики, а также акулы. В меню не была указана видовая принадлежность выбранных компонентов (например, «лосось», а не «лосось атлантический»). Всего было проанализировано 27 образцов из 6 точек розничной торговли (крупные торговые сети по реализации блюд японской кухни) и 3 ресторанов в Воронеже. Нами было отмечено, что для амплификации ДНК лосося лучше использовать праймеры Fish F2_t1 и FR1d_t1. Для остальных образцов более предпочтительны праймеры Fish F2_t1 и Fish R2_t1. Последовательности были секвенированы, аннотированы и зарегистрированы в системе GenBank, им присвоены со-

ответствующие номера (GenBank accession numbers: KT719275 – KT719297). Полученные последовательности ДНК подвергли анализу на соответствие с другими последовательностями через систему BLAST и BoldSystem. Все совпадения нуклеотидной последовательности были свыше 98%. Если видовая идентификация в системах BLAST и BoldSystem не совпала, последовательности подвергли анализу через биоинформатический инструмент Mega6, при этом выбирали наиболее сходную нуклеотидную последовательность из системы GenBank и BoldSystem, далее проводили попарное сравнение с полученной нами последовательностью ДНК и оценивали генетическое расстояние. Результаты совпадения нуклеотидной последовательности с уже имеющимися в ключевых международных системах представлены в таблице.

В качестве «лосося» все выбранные коммерческие компании использовали филе атлантического лосося или семги (*Salmo salar*), который считается менее ценным, чем тихоокеанский

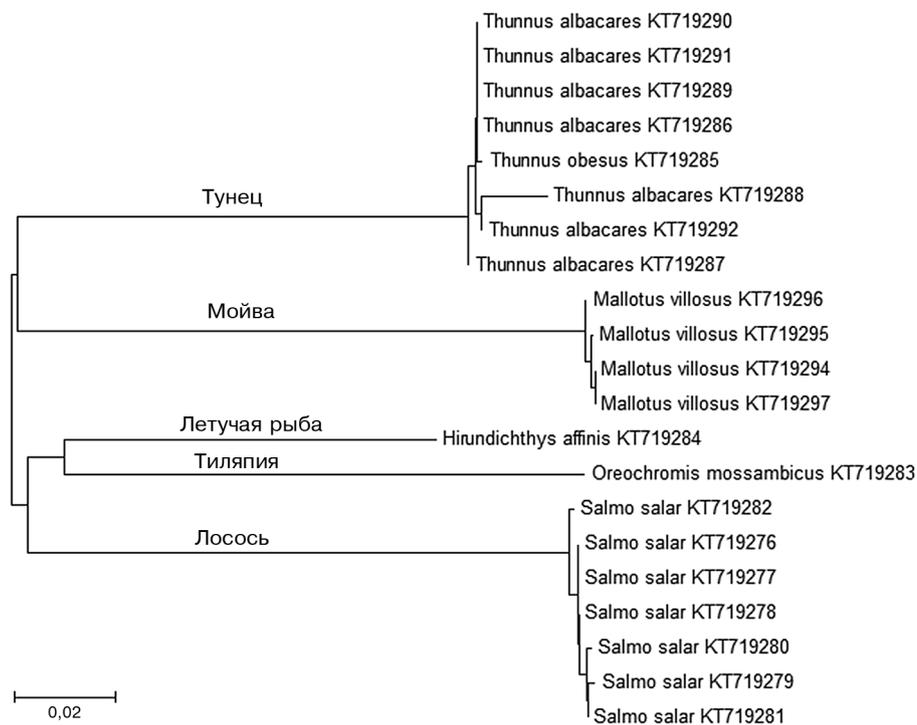


Рис. 1. Диаграмма, отражающая генетические различия между анализируемыми рыбными ингредиентами на основе К2Р параметра.

лосось. Также результаты баркодинга ДНК показали, что один из образцов «лосось» заменен на желтоперого тунца (*Thunnus albacares*). В то же время в одном из образцов «тунец» был заменен на филе атлантического лосося. Интересно отметить, что в основном под «тунцом» используется мясо желтоперого тунца, только в одном случае нами был идентифицирован большеглазый тунец (*Thunnus obesus*).

Иначе дело обстояло с икрой летучей рыбы (тобика). Как оказалось, только один образец соответствовал ДНК летучей рыбы, а именно ласточкокрылу обыкновенному (*Hirundichthys affinis*). В остальных образцах была идентифицирована ДНК мойвы.

При анализе образца «акула» из крупной торговой сети суши и роллов нами была идентифицирована ДНК мозамбикской тилипии, которая относится к семейству цихлид. Данный вид рыб является легко производимым и распространенным коммерческим видом пресноводных рыб и не имеет ничего общего с акулой.

При проведении секвенирования в ряде образцов нами были получены так называемые двоящиеся сиквенсы. В частности, этот тип данных был получен для образцов «лосось» и «летучая рыба». Данное явление возникает, когда при секвенировании по методу Сенгера присутствуют две матрицы ДНК вместо одной. В этом случае сигналы флуоресценции от дидизоксинуклеотидов перекрывают друг друга. Причем сила сигнала флуоресценции зачастую не зависит от количества матрицы. Обычно при получении такого вида картины не представляется возможным определить нуклеотидную последовательность искомого фрагмента ДНК. Однако мы провели анализ полученной картины с методологическим подходом, основанным на вероятности присутствия ДНК определенного организма. Нами проводилось вычленение искомой последовательности ДНК, при этом фиксировалась последовательность оставшихся нуклеотидов на диаграмме. При анализе «двоящегося» сиквенса из образца «летучая рыба» мы вычленили возможную последовательность *Mallotus villosus* (мойва). В двух образцах «летучая рыба» нами был получен 117 п.н. и 122 п.н. фрагмент, соответствующий ДНК мойвы, «параллельной» матрицей оказалась ДНК ласточкокрыла обыкновенного. Таким образом, в двух образцах «летучая рыба» присутствовала смесь ДНК мойвы и ласточкокрыла, что означает присутствие икры двух организмов в пищевом субстрате.

При проведении баркодинга ДНК практически полностью исключается ошибка идентификации таксона организма ввиду различия в генетическом расстоянии последовательности генов цитохромоксидазы. На рис. 1 изображено генетическое дерево, показывающее относительное генетическое расстояние у анализируемых нами объектов. Генетическое расстояние между *Thunnus albacares* и *Salmo salar* составило в среднем 0,23; между *Mallotus villosus* и *Hirundichthys affinis* 0,25.

Наибольшее удивление вызвал тот факт, что в одном из образцов «лосось» на основе баркодинга ДНК были идентифицированы бактерии *P. fluorescens*. Известно, что эти бактерии вызывают поражения различных органов у лососей [16] и являются распространенным возбудителем заболеваний у данного вида рыб. Факт того, что баркодинг ДНК осуществился по матрице бактерии, а не лосося, может являться чрезвычайным сигналом. Это может означать, что ДНК лосося сильно деградировала (возможно, вследствие длительного и/или неправильного режима хранения) с одновременным присутствием в филе большой биомассы бактерий. Согласно ветеринарным нормам, при установлении диагноза на псевдомоноз хозяйство объявляют неблагополучным и вводят ограничения на перевозки рыб, не допуская их вывода для целей рыборазведения. Более того, данный вид бактерий способен вызывать болезни у людей со слабым иммунитетом [17, 18].

В одном из образцов «лосось» в «двоящимися» сиквенсами также была идентифицирована эта бактерия. При анализе двоящегося сиквенса вычленили возможную последовательность *Salmo salar* (лосось атлантический). Была выделена последовательность ДНК 110 п.н., соответствующая ДНК атлантического лосося, «параллельная» матрица принадлежала ДНК бактерии *P. fluorescens*. Таким образом, в образце «лосось», помимо ДНК атлантического лосося, присутствовала ДНК *P. fluorescens*, что может говорить о значительном бактериальном загрязнении пищевого субстрата.

Чтобы подтвердить гибридизацию праймеров, предназначенных для видовой идентификации рыб с ДНК *P. fluorescens*, была произведена ПЦР с ДНК, выделенной из типового штамма бактерий *P. fluorescens* (B-894 type strain), полученной из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ИБФМ РАН, г. Пушкино). В ходе ПЦР был получен продукт длиной около 700 п.н. (рис. 2, А). Длина продукта совпала с теоретически ожидаемой. Чтобы верифицировать амплификацию именно гена цитохромоксидазы субъединицы 1 бактерий, был произведен рестрикционный анализ продукта ПЦР с рестриктазой Taq I, которая расщепляет ДНК в сайте TCGA. Были получены 3 отрезка длиной около 310, 260 и 130 п.н. (рис. 2, В). Длины отрезков совпали с теоретически ожидаемой для *P. fluorescens*, аннотированные последовательности гена цитохромоксидазы которых зарегистрированы в системе Genbank, в частности: *P. fluorescens* Pf29Arp (ANOR01000023.1), *P. fluorescens* F113 (CP003150.1), *P. fluorescens* strain FW300-N2E2 (CP015225.1), *P. fluorescens* strain Tapajos6 (JF745539.1). Таким образом, праймеры Fish F2_t1 и Fish R2_t1 способны амплифицировать ген цитохромоксидазы субъединицы 1 бактерий рода *Pseudomonas*.

При проведении биоинформатического анализа на степень гомологии праймеров, используемых для баркодинга ДНК рыбных продуктов с ДНК атлантического *S. salar* и *P. fluorescens*, было установлено, что прямой праймер как в случае с бактерией, так и в случае с лососем, имеет 100% гомологию (за исключением 2–3 нуклеотидов на 5'-конце у *P. fluorescens*, что,

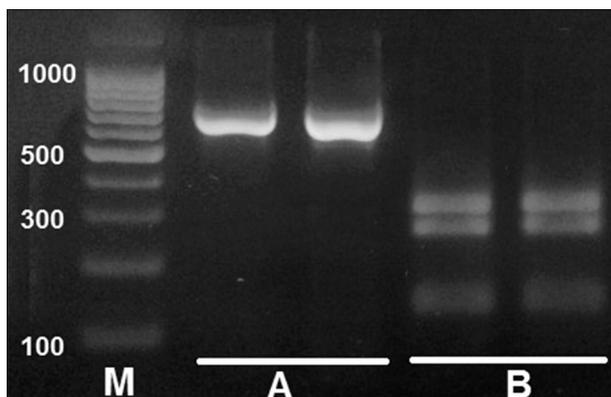


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР гена цитохромоксидазы бактерии *P. fluorescens*.

A – продукт ПЦР до рестрикции; B – продукты ПЦР после обработки рестриктазой Taq I.

Праймер Fish R2_t1: TCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA

ДНК *Salmo salar*: TCTGGATGCCCAAAGAACCAAAA

** * * * * * * * * * * *

Праймер Fish R2_t1: TCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA

ДНК *Pseudomonas fluorescens*: TCAGGGTGACCGAAGACTCAGAA

***** * * * * *

Рис. 3. Гомология обратного праймера Fish R2_t1 к ДНК *Salmo salar* и *P. fluorescens*.

как известно, не является ключевым фактором, влияющим на гибридизацию праймеров, поскольку Taq-полимераза начинает синтез с 3'-конца). Обратный праймер имел большую степень гомологии с ДНК *P. fluorescens*, чем с ДНК *S. salar*; в том числе на 3'-конце праймера (рис. 3).

Таким образом, амплификация гена цитохромоксидазы субъединицы 1 бактерий *P. fluorescens* при использовании праймеров Fish F2_t1 и Fish R2_t1 скорее всего обусловлена низкой степенью гомологии обратного праймера Fish R2_t1 с ДНК *S. salar* и высокой степенью гомологии с ДНК *P. fluorescens*. Поэтому необходимо избегать использования данного праймера при проведении баркодинга ДНК лососей из-за его высокой степени гомологии с ДНК бактерий рода *Pseudomonas* и, возможно, других морских холодноводных гамма-протеобактерий.

Учитывая тот факт, что бактерии обнаружены на основе неспецифического молекулярно-генетического метода, было решено провести идентификацию данной бактерии на основе видоспецифичных праймеров. В качестве таких праймеров нами была выбрана пара: 16SPSEнF 5'-TGCATTCAAAGACTGACTG-3'; 16SPSER 5'-AATCACACCGTGGTAACCG-3', которая является специфичной к данной бактерии и амплифицирует участок гена 16S рРНК [19]. С ДНК имеющихся образцов лосося была проведена ПЦР с использованием данной пары праймеров. После ПЦР был проведен электрофорез в агарозном геле. На рис. 4 изображена электрограмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными к данной бактерии.

Во всех образцах присутствовал продукт ПЦР длиной около 850 п.н. Длина фрагмента совпала с теоретически ожидаемой. Для подтверждения того, что данный фрагмент принадлежит именно этой бактерии, нами были секвенированы данные продукты ПЦР. При анализе полученной последовательности в системе BLAST наблюдалось сходство не менее 99% с уже имеющимися, что свидетельствует о том, что продукт ПЦР амплифицировался на ДНК бактерий группы *Pseudomonas fluorescens*. Таким образом, эти бактерии присутствуют во всех образцах лосося, что говорит о том, что лосось, поставляемый в сети розничной торговли и рестораны, являлся зараженным данной бактерией.

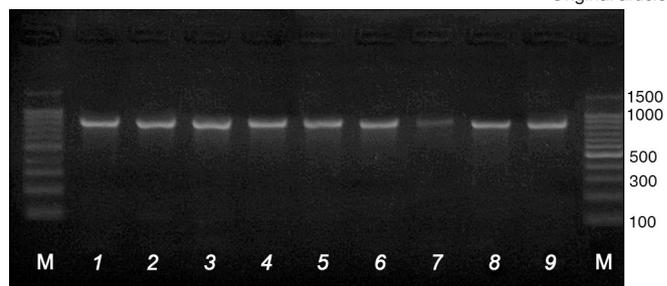


Рис. 4. Наличие продукта ПЦР длиной около 850 п.н. с праймерами, специфичными к бактерии *P. fluorescens*, при анализе филе лосося.

1–9 – номер пробы; M – маркеры известной длины, цифровые значения выражены в парах нуклеотидов.

Заключение

Выявление замены рыбных ингредиентов в японских деликатесах с помощью метода баркодинга ДНК показало свою эффективность. Из 27 отобранных образцов только один образец не удалось идентифицировать вследствие контаминации образца ДНК неизвестной природы. Из 26 образцов 7 образцов были полностью заменены, ещё в двух образцах была смесь исходного продукта с другим подобным ингредиентом (икра мойвы и икра летучей рыбы). Замена рыбных ингредиентов бывает как в точках розничной торговли, так и в ресторанах. В образцах мяса лосося идентифицирована бактерия *P. fluorescens*. Показано, что праймеры, используемые для баркодинга ДНК, имеют высокую степень гомологии с ДНК бактерий группы *P. fluorescens*. Обнаружение с помощью баркодинга ДНК и последующего анализа с использованием видоспецифических праймеров бактерии *P. fluorescens* в образцах лосося является тревожным сигналом. Выявления присутствия *P. fluorescens* в рыбной продукции в первую очередь свидетельствует о возможной контаминации рыбной продукции другими галофильными и психротрофными возбудителями пищевых инфекций. Кроме того, обнаружение данной бактерии свидетельствует о том, что лосось, поставляемый в точки розничной торговли и рестораны, являлся зараженным, а также о несоблюдении условий его хранения, поскольку эти бактерии хорошо размножаются даже при низких температурах [20]. Возможно, следует уделить большее внимание наличию данной бактерии в лососевых при выращивании данных рыб на специализированных фермах.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература / References

- Hebert P.D., Gregory T.R. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Syst. Biol.* 2005; 54(5): 852–9.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 2003; 270(1512): 313–21.
- Ferri G., Alù M., Corradini B., Licata M., Beduschi G. Species identification through DNA «barcodes». *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2009; 13(3): 421–6.
- Hebert P.D., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.* 2003; 270(Suppl. 1): S96–9.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012; 109(16): 6241–6.
- Dong W., Cheng T., Li C., Xu C., Long P., Chen C. et al. Discriminating plants using the DNA barcode rbcLb: an appraisal based on a large data set. *Mol. Ecol. Resour.* 2014; 14(2): 336–43.
- Galimbertia A., de Mattia F., Losaa A., Brunia I., Federicia S., Casiraghia M. et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Res. Int.* 2014; 50(1): 55–63.
- Valentini A., Miquel C., Nawaz M.A., Bellemain E., Coissac E., Pompanon F., et al. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Ecol. Resour.* 2009; 9(1): 51–60.
- Shokralla S., Zhou X., Janzen D.H., Hallwachs W., Landry J., Jacobus L.M. et al. Pyrosequencing for Mini-Barcoding of Fresh and Old Museum Specimens. *PLoS One.* 2011; 6(7): e21252.

10. Cawthorne D., Steinman H.A., Witthuhn R.C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Res. Int.* 2012; 46(1): 30–40.
11. Helyar S.J., Lloyd H.D., de Bruyn M., Leake J., Bennett N., Carvalho G.R. Fish Product Mislabelling: Failings of Traceability in the Production Chain and Implications for Illegal, Unreported and Unregulated (IUU) Fishing. *PLoS One.* 2014; 9(6): e98691.
12. Linga K.H., Cheunga C.W., Cheng S.W., Cheng L., Lib S., Nicholse P.D. et al. Rapid detection of oilfish and escolar in fish steaks: A tool to prevent keriorrhea episodes. *Food Chem.* 2008; 110(2): 538–46.
13. Triantafyllidis A., Karaiskou N., Perez J., Martinez J.L., Roca A., Lopez B. et al. Fish allergy risk derived from ambiguous vernacular fish names: Forensic DNA-based detection in Greek markets. *Food Res. Int.* 2010; 43: 2214–6.
14. Novotny L., Dvorska L., Lorencova A., Beran V. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Vet. Med.* 2004; 49(9): 343–58.
15. Rosenblum B.B., Lee L.G., Spurgeon S.L., Khan S.H., Menchen S.M., Heiner C.R. et al. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic. Acids Res.* 1997; 25(22): 4500–4.
16. Colquhoun D.J., Skjerve E., Poppe T.T. Pseudomonas fluorescens, infectious pancreatic necrosis virus and environmental stress as potential factors in the development of vaccine related adhesions in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.J. *Fish Dis.* 1998; 21(5): 355–64.
17. Gershman M.D., Kennedy D.J., Noble-Wang J., Kim C., Gullion J., Kacica M. et al. Multistate outbreak of Pseudomonas fluorescens bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(11): 1372–9.
18. Scales B.S., Dickson R.P., LiPuma J.J., Huffnagle G.B. Microbiology, genomics, and clinical significance of the Pseudomonas fluorescens species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(4): 927–48.
19. Scarpellini M., Franzetti L., Galli A. Development of PCR assay to identify Pseudomonas fluorescens and its biotype. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 236(2): 257–60.
20. Wong V., Levi K., Baddal B., Turton J., Boswell T.C. Spread of Pseudomonas fluorescens Due to Contaminated Drinking Water in a Bone Marrow Transplant Unit. *J. Clin Microbiol.* 2011; 49(6): 2093–6.

Поступила 21.06.16
Принята к печати 04.10.16

© ТИМЕРЗЯНОВ М.И., ПИВОВАРОВ Ю.П., 2017

УДК 613.2:343.81

Тимерзянов М.И.¹, Пивоваров Ю.П.²

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЧЕСТВА ПИТАНИЯ ОСУЖДЕННЫХ, ОТБЫВАЮЩИХ НАКАЗАНИЕ В ИСПРАВИТЕЛЬНЫХ КОЛОНИЯХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

¹ ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, Казань;

² ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва

Вопросы питания осужденных за годы существования Советского Союза и в настоящее время являются малоизученными. Граждане, содержащиеся в пенитенциарных учреждениях имеют специфические социально-демографические характеристики. Наряду с неудовлетворительными санитарно-бытовыми условиями осужденных в колониях важное значение приобретает гигиеническая оценка их питания. Без надлежащей оценки гигиенического питания осужденных невозможно разработать эффективные мероприятия по улучшению их здоровья. С учетом этого в статье показана гигиеническая оценка фактического питания осужденных за 2009–2012 гг. согласно приказу Министерства юстиции России от 02.08.05 № 125 по 320 меню-раскладкам. Представлены данные о калорийности рационов питания осужденных на лишение свободы в колониях на территории РТ, об обеспеченности организма белками, жирами, углеводами, витаминами, минеральными веществами, такими как кальций, фосфор, магний. Дан анализ соотношения белков, жиров и углеводов в питании осужденных, а также кальция и фосфора.

Ключевые слова: питание осужденных; пищевая ценность рациона.

Для цитирования: Тимерзянов М.И., Пивоваров Ю.П. Гигиеническая характеристика питания осужденных, отбывающих наказание в исправительных колониях на территории Республики Татарстан. *Гигиена и санитария.* 2017; 96(5): 488–492. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-5-488-492>

Timerzyanov M.I.¹, Pivovarov Yu.P.²

HYGIENIC CHARACTERISTICS OF NUTRITION OF CONVICTS SERVING SENTENCES IN PENAL COLONIES IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF TATARSTAN

¹Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation

The issues of nutrition of convicts, for years of existence of the Soviet Union and currently, are not studied completely. Citizens detained in penitentiary institutions (PI) have specific socio-demographic characteristics. Along with the unsatisfactory sanitary conditions for convicts in the colonies, the hygienic assessment of their nutrition becomes important. Without proper hygienic evaluation of food it is impossible to develop effective interventions to improve their health. Taking this into account, the article shows the hygienic assessment of the actual nutrition of convicts over the period of 2009–2012, according to 320 menu layouts accepted by the Order Ministry of Justice of Russia, No. 125, August, 2005. There are presented data on caloric value of diets of persons sentenced to imprisonment in penal colonies in the Republic of Tatarstan, provision of the body by proteins, fats, carbohydrates, vitamins, minerals such as calcium, phosphorus, magnesium. There is given the analysis of the ratio of proteins, fats and carbohydrates in the diet of prisoners, as well as calcium and phosphorus.

Key words: nutrition of convicted; nutritional value of food.

For citation: Timerzyanov M.I., Pivovarov Yu. P. Hygienic characteristics of nutrition of convicts serving sentences in penal colonies in the territory of the Republic of Tatarstan. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2017; 96(5): 488–492. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-5-488-492>

For correspondence: Marat I. Timerzyanov, MD, Ph.D., Assistant of the Department of Epidemiology of the Kazan State Medical University. E-mail: Marat.Timerzyanov@tatar.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: 11 January 2016

Accepted: 13 May 2016