

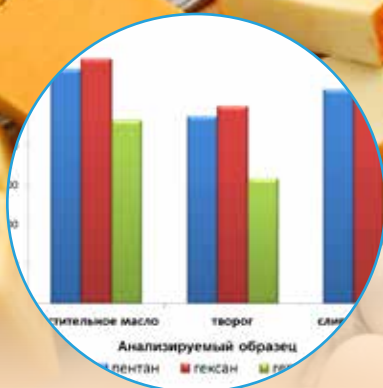
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

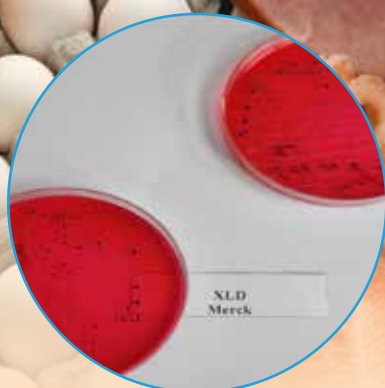
VETERINARY TODAY

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАЛЬСИФИКАЦИИ
МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ
И РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ
ПО ЖИРНОКИСЛОТНОМУ
СОСТАВУ стр. 20**

**DETERMINATION OF ADULTERATIONS
IN DAIRY PRODUCTS AND VEGETABLE
OILS BASED ON THEIR FATTY
ACID COMPOSITIONS
p. 20**



**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА
КАЧЕСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ
РОДА САЛЬМОНЕЛЛА
стр. 39**

**COMPARATIVE EVALUATION
OF MEDIA USED
FOR DETECTION
OF SALMONELLA SPP.
p. 39**



**КОРОНАВИРУСНЫЕ
ЗООНОЗЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ
С РУКОКРЫЛЫМИ
стр. 66**

**CORONAVIRUS ZOOZOSES
ASSOCIATED WITH
CHIROPTERA
p. 66**

Журнал «Ветеринария сегодня»
включен в Перечень рецензируемых
научных изданий (ВАК)

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



Ведущий центр разработчиков и производителей ветеринарных препаратов для профилактики и диагностики болезней птиц, свиней и рогатого скота (производится более 100 наименований вакцин и около 50 наименований диагностических наборов).

• Референтная лаборатория по бешенству в РФ Международные статусы ФГБУ «ВНИИЗЖ»:

• Референтная лаборатория по гриппу и ньюкаслской болезни птиц в РФ

• Испытательный центр

Деятельность осуществляется в соответствии с межгосударственными стандартами (идентичные международным) ГОСТ ISO 9001-2011 (ISO 9001:2008), ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 (ISO/IEC 17025:2005) и национальным стандартом (идентичным правилам GMP Европейского Союза) ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств»

• Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья

• Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру

• Референтный центр FAO по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец
Тел./факс: (4922) 26-38-77, 26-15-25, 26-15-51, 38-30-30, 26-18-56
Тел.: (4922) 26-06-14, 26-17-65
E-mail: mail@arriah.ru http://www.arriah.ru

Ветеринария сегодня №2 (17) 2016 научный журнал



Главный редактор:

Лозовой Дмитрий Анатольевич – кандидат ветеринарных наук, директор ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, тел./факс. 8-4922-26-15-73, e-mail: lozovoy@arriah.ru

Шеф-редактор: Юлия Мелано

Выпускающие редакторы: Ольга Борисова, Ольга Лесных, Юлиана Бададгулова
e-mail: veterinarytoday@yandex.ru, тел.: +7 915 477 78 36
borisova@arriah.ru; 8 (4922) 26 15 12, доп. 22-27

Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:



Борисова О.А. – кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ» – выпускающий редактор;



Василевич Ф.И. – ректор Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, доктор ветеринарных наук, академик РАН, профессор кафедры паразитологии и инвазионных болезней животных;



Власов Н.А. – доктор биологических наук, профессор, зам. руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, г. Москва;



Груздев К.Н. – доктор биологических наук, профессор, главный эксперт по болезням свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



Иголкин А.С. – кандидат ветеринарных наук, зав. лабораторией ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



Исаева Г.С. – д.ф.н., к.с.-х.н., вице-министр Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан;



Ирза В.Н. – доктор ветеринарных наук, главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



Красочко П.А. – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, академик РАЕН, директор РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь;



Макаров В.В. – доктор биологических наук, профессор, академик РАЕН, заведующий кафедрой ветеринарной патологии РУДН, г. Москва;



Мищенко В.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



Непоклонов Е.А. – доктор биологических наук, профессор, зам. руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, г. Москва;



Пивовар В.П. – директор Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия, главный государственный инспектор Республики Беларусь, г. Минск;



Плющиков В.Г. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, декан РУДН, г. Москва;



Прохватилова Л.Б. – кандидат биологических наук, доцент, начальник отдела координации НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



Прунтова О.В. – доктор биологических наук, профессор, гл. эксперт по пищевой безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



Русалеев В.С. – доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



Самуйленко А.Я. – академик РАН, профессор, директор ФГБУ ВНИИТБП, г. Щелково;



Сисягин П.Н. – член-корреспондент РАН, профессор, директор ФГБУ НИВИ НЗ России, г. Нижний Новгород;



Старов С.К. – кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ» – зам. главного редактора;



Шахов А.Г. – член-корреспондент РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, ГНУ ВНИИВФТИ Россельхозакадемии, г. Воронеж.

Дизайн и верстка: Мария Поваляева

Корректор: Лариса Грибникова

Менеджер по подписке и дистрибуции: Игорь Алпатов +7 (925) 357 20 61

Журнал «Ветеринария сегодня» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций, свидетельство о регистрации № ФС77-47033 от 21 марта 2012 г.

Научный журнал «Ветеринария сегодня» включен в информационно-аналитическую систему – Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки eLIBRARY.RU.

Тираж 2000 экземпляров. Цена свободная.

Учредитель: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Издатель: ООО «Успех»

105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д.13, оф. 402

Адрес редакции: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Типография: ООО «Юнион Принт», 603022, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, Окский Съезд, д. 2, тел.: (831) 439-44-99

Подписано в печать 19 мая 2016 года

Дата выхода 27.05.2016

СОДЕРЖАНИЕ

НОВОСТИ

6 Об участии специалистов ФГБУ «ВНИИЗЖ» в очередном заседании Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ

О разработке новой вакцины против ящура типа А генетической линии A GVII и поставке данного препарата в Республику Армения

7 О поставке эмульсионной противоящурной вакцины «АРРИАХ-ВАК» в Республику Ирак

О визите главного ветеринарного врача ФАО Хуана Луброта в ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ПИЩЕВАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

8 О.И. Ручнова, О.В. Прунтова, Д.А. Лозовой
Основные принципы планирования государственного ветеринарного мониторинга продукции животного происхождения

20 Д.С. Большаков, Д.В. Юдина, Т.Б. Никешина
Определение фальсификации молочной продукции и растительных масел по жирнокислотному составу

31 Н.Б. Шадрова, О.В. Прунтова, Г.С. Скитович
Протеомические свойства изолятов бактерии рода *Salmonella*

39 Г.С. Скитович, К.В. Серова, Н.Б. Шадрова, О.В. Прунтова
Сравнительная оценка качества питательных сред для выявления бактерий рода *Salmonella*

46 И.В. Подколзин, А.И. Соловьёв
Оценка возможностей масс-спектрометрии изотопных отношений при установлении географического происхождения цельного молока

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

52 О.Г. Губенко, О.П. Бьядовская, С.В. Кононова, Ю.Ю. Бабин, Н.А. Солоухина, А.В. Кононов
Получение специфических компонентов иммуноферментной тест-системы для выявления антигена вируса болезни Шмалленберга

БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

56 Д.А. Лозовой, А.К. Караулов, К.Н. Груздев
Биологическая безопасность свиноводческих хозяйств

61 В.И. Павелко, Ю.Ю. Бабин, А.В. Пискунов, А.В. Спрыгин, О.В. Прунтова
Идентификация *Haemophilus parasuis* с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии

КОРОНАВИРУСНЫЕ ЗООНОЗЫ

66 В.В. Макаров, Д.А. Лозовой
Коронавирусные зоонозы, ассоциированные с рукокрылыми

CONTENTS

FOOD SAFETY

14 O.I. Ruchnova, O.V. Pruntova, D.A. Lozovoy
Basic principles of planning animal product national veterinary monitoring

20 D.S. Bolshakov, D.V. Yudina, T.B. Nikesheina
Determination of adulterations in dairy products and vegetable oils based on their fatty acid compositions

35 N.B. Shadrova, O.V. Pruntova, G.S. Skitovich
Proteomic properties of *Salmonella* isolates

39 G.S. Skitovich, K.V. Serova, N.B. Shadrova, O.V. Pruntova
Comparative evaluation of media used for detection of *Salmonella* spp.

46 I.V. Podkolzin, A.I. Solovyev
Assessing applicability of isotope-ratio mass spectrometry (IRMS) for geographical identification of whole milk

CATTLE DISEASE

52 O.G. Gubenko, O.P. Bjadovskaya, S.V. Kononova, Yu.Yu. Babin, N.A. Soloukhina, A.V. Kononov
Preparation of specific components of Elisa test-system for detection of Schmallenberg disease virus antigens

SWINE DISEASE

56 D.A. Lozovoy, A.K. Karaulov, K.N. Gruzdev
Biological security of pig farms

61 V.I. Pavelko, Yu.Yu. Babin, A.V. Piskunov, A.V. Sprygin, O.V. Pruntova
Identification of *Haemophilus parasuis* using MALDI-TOF mass spectrometry

CORONAVIRUS ZOOZOSES

66 V.V. Makarov, D.A. Lozovoy
Coronavirus zoonoses associated with chiroptera



ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Осуществляет проведение независимых испытаний пищевой продукции, продовольственного сырья и кормов для животных по показателям качества и безопасности, определяющим степень соответствия их нормам и требованиям действующих Технических регламентов (ТР) Таможенного союза (ТС), ГОСТов, СанПиН и других нормативных документов (НД) Таможенного союза и Российской Федерации.

Деятельность Испытательного центра ФГБУ «ВНИИЗЖ» имеет широкую область аккредитации и регламентируется

- Аттестатом аккредитации Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в Системе ГОСТ Р на соответствие требованиям стандарта ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025 на техническую компетентность и независимость (бессрочно с расширением области аккредитации).

- Свидетельством об аккредитации управления Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору по Владимирской области в качестве органа по сертификации, осуществляющего работы в области подтверждения соответствия качества и безопасности зерна, комбикормов и компонентов для их производства, а также побочных продуктов переработки зерна.

- Свидетельством об аккредитации Словацкой национальной аккредитационной службой (SNAS) на соответствие требованиям международного стандарта ISO/IEC 17025:2005. Протоколы о проведении таких испытаний имеют силу во всех странах Европейского союза, а также азиатского региона.

Испытательный центр ФГБУ «ВНИИЗЖ» располагает материально-технической базой, необходимой для проведения испытаний, включающей уникальное испытательное оборудование, средства измерений, стандартные образцы и реактивы, необходимые для проведения испытаний в соответствии с требованиями НД и обеспечивающей безопасность персонала и охрану окружающей среды.



Испытательный центр ФГБУ «ВНИИЗЖ» проводит испытания продукции по следующим направлениям (область аккредитации):

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

1. Хлебобулочные и макаронные изделия.
2. Продукция сахарной промышленности (сахар-песок, сахар-рафинад).
3. Изделия кондитерские сахаристые.
4. Продукция винодельческой промышленности.
5. Продукция производства безалкогольных напитков.
6. Вода питьевая.
7. Мясо, субпродукты охлажденные, замороженные, мясные и растительные мясосодержащие консервы, мясные полуфабрикаты.
8. Продукция молочной и маслосыроработной промышленности.
9. Пищевая масложировая продукция.
10. Непищевая масложировая продукция (глицерин натуральный дистиллированный, мыло хозяйственное).

11. Соковая продукция из фруктов и овощей.
12. Зерно и продукты его переработки.
13. Продукты рыбной промышленности.
14. Мёд, продукция пчеловодства.
15. Пищевые концентраты и крахмал.

16. Растительные масла, продукты переработки растительных масел.
17. Овощи.

КОРМА

1. Корма растительного происхождения.
2. Зерно злаковых, бобовых и масличных культур на кормовые цели.
3. Кормовые продукты перерабатывающей промышленности: жмыхи, шроты, отруби, жом сушеный.
4. Корма животного происхождения, жир кормовой.
5. Кормовые добавки минерального происхождения.
6. Комбикорма, премиксы, белково-витаминные добавки.

Реестр испытательных лабораторий можно посмотреть на официальном сайте Евразийской экономической комиссии www.tsour.ru в разделе «Единый реестр органов по сертификации и испытательных лабораторий (центров) Таможенного союза» и на официальном сайте Росаккредитации <http://fsa.gov.ru> в разделе «Реестры».

Наш адрес: Россия, 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Тел. 8 (4922) 52-99-22

E-mail: ic@arriah.ru Сайт: <http://arriah.ru>

ОБ УЧАСТИИ СПЕЦИАЛИСТОВ ФГБУ «ВНИИЗЖ» В ОЧЕРЕДНОМ ЗАСЕДАНИИ МЕЖПРАВИТЕЛЬСТВЕННОГО СОВЕТА ПО СОТРУДНИЧЕСТВУ В ОБЛАСТИ ВЕТЕРИНАРИИ СНГ

С 11 по 13 мая 2016 года в д. Косичи Брестской области Республики Беларусь состоялось очередное заседание Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ. В работе совета приняли участие руководители и представители государственных ветеринарных служб республик Армения, Беларусь, Казахстан, Молдова, Таджикистан, Кыргызской Республики, Российской Федерации и Туркменистана, проинформировавшие участников об эпизоотической ситуации в своих странах.

На заседании были заслушаны и рассмотрены актуальные вопросы, касающиеся совместных действий ветеринарных служб государств — участников СНГ.

Россельхознадзор представлял начальник Управления ветеринарного надзора при экспортно-импортных операциях, на транспорте и международного сотрудничества Константин Савенков, а также директор подведомственного Россельхознадзора ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» Дмитрий Лозовой.

Решением совета была одобрена представленная в докладах информация. ФГБУ «ВНИИЗЖ» как коор-

динатору работ и мероприятий по Комплексу совместных мер с учетом состоявшегося обсуждения поручено доработать информацию и внести её в Исполнительный комитет СНГ до 1 июня 2016 года для рассмотрения в установленном порядке высшими органами СНГ. Кроме того, ФГБУ «ВНИИЗЖ» как Центру МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья было поручено подготовить проект Комплекса совместных действий государств — участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года к очередному заседанию совета.

В перерывах между заседаниями К. Савенков, Д. Лозовой и А. Метлин провели деловые переговоры с представителями ветеринарных служб стран СНГ по расширению сотрудничества по обеспечению ветеринарного благополучия территорий Содружества. Следующее заседание Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ намечено провести во II квартале 2017 г.

О РАЗРАБОТКЕ НОВОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЯЩУРА ТИПА А ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ A GVII И ПОСТАВКЕ ДАННОГО ПРЕПАРАТА В РЕСПУБЛИКУ АРМЕНИЯ

В марте 2016 года подведомственным Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» была осуществлена первая поставка вакцины против ящура сорбированной моно- и поливалентной (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21), содержащей в своем составе антиген ящура типа А генетической линии A GVII, для нужд Министерства сельского хозяйства Республики Армения.

Данный препарат была разработан в кратчайшие сроки с целью профилактики ящура типа А генетической линии A GVII, занесенного с полуострова Индостан и вызвавшего в конце 2015 года вспышки заболевания на территории Саудовской Аравии, Турции, Ирана и в 2016 году в Республике Армения.

Сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» были изучены иммуно-биологические свойства вируса ящура типа А, определено антигенное соответствие данного изолята

с производственными штаммами вируса ящура типа А. Результаты исследований показали, что используемые противоящурные вакцины, имеющие антигены (A Iran 2005; A TUR 20/06; A22 IRQ64, A SEA-97), не обеспечивают защиты животных. На основании полученных результатов данный штамм был рекомендован в качестве производственного.

Сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» была разработана вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21), содержащая в своем составе антиген ящура типа А генетической линии A GVII. Вакцина разработана в соответствии с международными стандартами организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP EC), выпускается в ФГБУ «ВНИИЗЖ» и является высококачественным ветеринарным биопрепаратом.

О ПОСТАВКЕ ЭМУЛЬСИОННОЙ ПРОТИВЯЩУРНОЙ ВАКЦИНЫ «АРРИАХ-ВАК» В РЕСПУБЛИКУ ИРАК

В марте 2016 года в рамках научно-технического сотрудничества подведомственный Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» совершил первую крупную поставку эмульсионной вакцины против ящура «АРРИАХ-ВАК» в Республику Ирак.

Разработанная в соответствии с международными стандартами организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP EC) противоящурная вакцина «АРРИАХ-ВАК» является уникальным высококачественным ветеринарным препаратом, не имеющим аналогов в Российской Федерации.

Отмеченная особым вниманием зарубежных партнеров, данная вакцина, обеспечивающая ликвидацию ящурных эпизоотий, быстрое купирование первичных очагов, создание устойчивого благополучия по ящуру в стране, уже получила признание в странах Ближнего Востока и Центральной Азии.

Учитывая опыт работы специалистов ФГБУ «ВНИИЗЖ» по разработке и осуществлению комплекса противоящурных мероприятий, обеспечивающих ликвидацию ящура в стране, представители Республики Ирак выразили заинтересованность в дальнейших совместных мероприятиях по регулированию эпизоотической ситуации в регионе.

О ВИЗИТЕ ГЛАВНОГО ВЕТЕРИНАРНОГО ВРАЧА ФАО ХУАНА ЛУБРОТА В ФГБУ «ВНИИЗЖ»

В рамках рабочего визита в марте 2016 г. подведомственный Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» посетил главный ветеринарный врач ФАО Хуан Луброт. Целью визита стало обсуждение вопросов по запуску программ, разработанных ФГБУ «ВНИИЗЖ»:

- контроль ящура в странах Закавказья;
- контроль и искоренение чумы мелких жвачных (ЧМЖ) в странах Средней Азии.

Специалисты ФГБУ «ВНИИЗЖ» подробно рассказали гостю о деятельности Центра, в частности, остановившись на работе референтной лаборатории диагностики ящура и информационно-аналитического центра Россельхознадзора, референтной лаборатории диагностики вирусных болезней птиц.

Стороны обсудили проект программы надзора за ящуром в странах Закавказья, проект программы по прогрессивному контролю и ликвидации чумы мелких жвачных на территории Кыргызской Республики и Республики Таджикистан.

Особое внимание было уделено эпизоотической ситуации по гриппу птиц в РФ и сопредельных странах, международное сотрудничество по контролю гриппа птиц и мониторинг антибиотикорезистентности изолятов возбудителей болезней животных как этап стратегии контроля риска повышения устойчивости к антимикробным препаратам.

Продолжился визит инспекцией работы испытательного центра, виварного комплекса и лабораторий

на местах. Представитель ФАО ознакомился с научной и практической деятельностью подразделений и новейшим оборудованием, с помощью которого проводятся исследования.

В завершение визита представители сторон подвели краткие итоги состоявшейся встречи и пришли к договоренности по сотрудничеству в сфере обеспечения эпизоотологического благополучия стран.



ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПЛАНИРОВАНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОГО ВЕТЕРИНАРНОГО МОНИТОРИНГА ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

О.И. Ручнова¹, О.В. Прунтова², Д.А. Лозовой³

¹ ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ruchnova@arriah.ru

² руководитель Испытательного центра, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты отбора основных показателей и оптимизации методики расчета количества образцов для химических (остатков запрещенных и вредных веществ), микробиологических и радиологических исследований, ежегодно проводимых в рамках «Плана государственного ветеринарного лабораторного мониторинга остатков запрещенных и вредных веществ в организме живых животных, продукции животного происхождения и кормах на территории РФ» Федеральным центром охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Ключевые слова: мониторинг, химические, микробиологические, радиологические показатели, пищевые продукты, загрязняющие вещества.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с вступлением во Всемирную торговую организацию (ВТО) Российская Федерация (РФ) ежегодно предоставляет в соответствующие международные организации информацию о государственном контроле качества и безопасности отечественной пищевой продукции, пищевого сырья, продукции животного и растительного происхождения [4, 14].

Одним из основных звеньев в системе государственного контроля за пищевой безопасностью является «Государственный ветеринарный лабораторный мониторинг остатков запрещенных и вредных веществ в организме живых животных, продукции животного происхождения и кормах на территории РФ». Планирование мониторинга пищевой безопасности продукции животного происхождения и кормов в РФ, так же как и в странах Европейского союза (ЕС), осуществляется в соответствии с требованиями Европейской Директивы 96/23/ЕС от 29 апреля 1996 года по исследованию остатков запрещенных и вредных веществ в организме живых животных и продуктах животного происхождения [2, 10], на основании «Концепции государственного ветеринарного лабораторного мониторинга остатков

запрещенных и вредных веществ в организме живых животных, продуктах животного происхождения и кормах на территории Российской Федерации на 2008 год и последующие годы», утвержденной руководителем Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору С.А. Данквертом 5 мая 2008 года, с учетом национальных особенностей и традиций, необходимого контроля лекарственных препаратов и ксенобиотиков, а также с учетом переходного периода и гармонизации законодательства Российской Федерации с ЕС [11, 12].

Несмотря на то, что перечень показателей безопасности сырья и продукции, подлежащих ветеринарному контролю (надзору), по которым проводят лабораторные исследования, определяется соответствующими нормативными правовыми актами, существует много факторов, увеличивающих вероятность присутствия запрещенных и вредных веществ в объектах контроля [3, 4]. К таким факторам относятся национальные особенности и традиции, эпизоотическая ситуация в отдельных регионах и возможности применения различных лекарственных препаратов и ксенобиотиков, в том числе и запрещенных в РФ [9]. В связи с этим возникает необходимость дифференцированного подхода к определению наиболее информативных показателей по безопасности объектов контроля в различных регионах РФ и усовершенствования методики, рекомендуемой Комиссией ЕС, расчета минимально необходимого для проведения мониторинговых исследований количества проб [13].

Целью данной работы было определение основных принципов отбора химических, радиологических и микробиологических показателей безопасности продукции животного происхождения, оптимизация методики расчета количества исследований для формирования «Плана государственного ветеринарного лабораторного мониторинга остатков запрещенных и вредных

веществ в организме живых животных, продукции животного происхождения и кормах на территории РФ» (План мониторинга).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Объектами контроля при проведении мониторинга являются сельскохозяйственные и дикие животные, продукция животного происхождения и корма, производимые на территории Российской Федерации (ПрРФ), территории Таможенного союза (ПрТС) и импортного производства (ИП).

Группы показателей. Согласно принятой классификации, по требованиям Европейской Директивы 96/23/ЕС, подлежащие контролю контаминанты разделены на несколько групп [2].

Группа «А» — вещества, имеющие анаболическое действие, и неразрешенные вещества:

(А1) Стельбены, производные стельбенов и их соли и эфиры;

(А2) Антитиреоидные средства (тиреостатики);

(А3) Стероиды;

(А4) Лактоны резорциловой кислоты, включая зеранол;

(А5) Бета-агонисты;

(А6) Иные вещества, включенные в приложение IV Регламента Совета (ЕЕС) №470/2009 от 6 мая 2009 года (хлорамфениколы, нитрофураны и их метаболиты, нитроимидазолы) [10].

Группа «В» — ветеринарные лекарственные средства и загрязнители:

(В1) Антибактериальные вещества, включая сульфаниламиды, хинолоны;

(В2) Прочие ветеринарные лекарственные средства:

(a) Антигельминтики;

(b) Кокцидиостатики;

(c) Карбаматы и пиретроиды;

(d) Седативные средства;

(e) Нестероидные противовоспалительные средства (NSAIDs);

(f) Прочие фармакологически активные вещества (согласно регистрации);

(В3) Прочие вещества и загрязнители окружающей среды:

(a) Хлорорганические соединения, включая ПХБ, диоксины;

(b) Фосфорорганические соединения;

Таблица 1

Группы остатков запрещенных и вредных веществ, которые подлежат контролю с учетом вида животного, предназначенных для них кормов и питьевой воды, а также полученного из этих животных продовольственного сырья

№ п/п	Группа веществ	Тип животного, продукция животного происхожд., кормов		Домашняя птица	Рыба и рыбная продукция (аквакультура)	Молоко и молочная продукция	Яйца	Мясо кролика и мясо дички и дичи, выращенной на ферме	Мед	Корма и кормовые добавки
		КРС, овцы, козы, свиньи, лошади								
1	A1	X	X	X				X		X
2	A2	X	X					X		X
3	A3	X	X	X				X		
4	A4	X	X					X		
5	A5	X	X					X		X
6	A6	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	B1	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	B2a	X	X	X	X	X		X		X
9	B2b	X	X				X	X		X
10	B2c	X	X					X	X	X
11	B2d	X								
12	B2e	X	X			X		X		
13	B2f									X
14	B3a	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15	B3b	X				X			X	X
16	B3c	X	X	X	X	X		X	X	X
17	B3d	X	X	X	X	X				X
18	B3e				X					
19	B3f									X
20	Фальсификация*					X				

* Фальсификация продуктов — это внесение посторонних веществ в продукты (мед, мясо, молоко и др.), что изменяет их качество и полноценность. Фальсифицированные продукты не допускаются для использования. Контроль фальсификации указанной продукции в РФ проводится постоянно в процессе проведения ВС, а также в рамках специальных программ мониторинга (наличие фосфатов, соли и др.) [6]. Также в настоящее время в РФ большое внимание уделяется исследованиям пищевых продуктов на наличие консервантов, рыбы — на гистамин и молочной продукции — на фальсификацию молочного жира по содержанию состава жирных кислот [5].

(с) Химические элементы: ртуть, свинец, кадмий, мышьяк (для пищевого сырья); ртуть, свинец, кадмий, мышьяк, медь, цинк, железо, сурьма, никель, селен, хром, фтор, молибден, кобальт (корма и кормовые добавки);

(d) Микотоксины;

(e) Красители (малахитовый зеленый, лейко-малахитовый, зеленый);

(f) Другие вещества, включая незапатентованные лекарственные средства, пестициды, биотоксины и радионуклиды (сумма ПАУ, в т.ч. бенз(а)пирен, нитрозамины, фикотоксины (ASP, DSP, PSP), 2,4-D кислота, ее соли и эфиры, гистамин, оксиметилфурфурол) (табл. 1).

Группа «Микробиологические показатели» включает патогенные и условно патогенные микроорганизмы:

(1) количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)/общая бактериальная обсемененность;

(2) бактерии группы кишечной палочки (БГКП, колиформные и колиформные бактерии)/энтеропатогенные типы кишечной палочки/токсинообразующие анаэробы;

(3) бактерии рода *Salmonella*;

(4) *Listeria monocytogenes*;

(5) *Vibrio parahaemolyticus*;

(6) бактерии рода *Clostridium* (сульфитредуцирующие клостридии);

(7) бактерии рода *Staphylococcus* (*S. aureus*);

(8) бактерии рода *Proteus*.

Методика расчета минимально необходимого для проведения мониторинговых исследований количества проб. Расчет минимально необходимого для проведения мониторинговых исследований количества проб осуществляется с использованием программы Евросоюза, размещенной на веб-сайте: http://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/pesticide_residues/index_en.htm [13]. Данная программа при введении данных о количестве поголовья и произведенной продукции автоматически производит расчет минимально необходимого количества проб/исследований по каждому виду исследуемой продукции и показателям безопасности. В программе приведено процентное соотношение по каждой группе показателей для расчета количества исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. **Общие положения при планировании и организации работы по мониторингу пищевой безопасности.** Организацию контроля безопасности продукции в регионах и отбор проб в целях обеспечения выполнения Плана мониторинга осуществляют территориальные управления Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, которые входят в зону обслуживания ФГБУ «ВНИИЗЖ». Приказом Россельхознадзора «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора для обеспечения выполнения требований Соглашения ВТО по СФС при вступлении России в ВТО» за ФГБУ «ВНИИЗЖ» закреплены следующие субъекты РФ:

- территориальное управление Россельхознадзора по Владимирской области;
- территориальное управление Россельхознадзора по Костромской и Ивановской областям;
- при необходимости вся Российская Федерация.

Проведение лабораторных исследований в соответствии с Планом мониторинга пищевой безопасности на

территории РФ осуществляется за счет средств федерального бюджета.

На каждый последующий год план мониторинга разрабатывает отдел координации НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ» в ноябре текущего года, используя для расчета результаты мониторинга предыдущего года. Для осуществления этой задачи отдел координации НИР до 1 ноября текущего года запрашивает следующую информацию у территориальных управлений Россельхознадзора, находящихся в зоне обслуживания: количество ферм, содержащихся и подвергнутых убою животных за прошедший год (по всем видам продуктивных животных), количество рыбозаводных и рыбодобывающих водоемов, пасек, кроликоферм, птицефабрик и птицеферм, а также объем производства продукции животного происхождения и кормов (в том числе количество предприятий по производству продуктов животного происхождения по видам продуктов и кормов), перечень ветеринарных лекарственных средств, применяемых для профилактики и лечения болезней животных, перечень используемых пестицидов.

Разработанный проект Плана мониторинга на следующий год, включающий данные по необходимому количеству исследований по всем видам продукции в отношении каждого субъекта РФ, а также требуемые объемы финансовых затрат на реализацию Плана мониторинга направляются в декабре текущего года в центральный аппарат (ЦА) Россельхознадзора для рассмотрения и утверждения в установленном порядке. Также этот проект размещается в ФГИС «АССОЛЬ» в разделе «План мониторинга». Утвержденный План мониторинга доводится до сведения ФГБУ «ВНИИЗЖ» ЦА Россельхознадзора в январе наступившего года.

Отдел координации НИР не позднее 1 марта текущего года составляет трехстороннее «Соглашение о взаимодействии» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», территориальное управление Россельхознадзора, орган управления ветеринарией субъекта РФ), в котором согласованы наименования показателей при реализации Плана мониторинга на текущий год. Отчеты по результатам Плана мониторинга за прошедший год направляются в ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» до 1 февраля следующего после отчетного периода года.

В течение года может производиться корректировка Плана мониторинга безопасности продукции и сырья с учетом выявляемых в ходе его реализации ветеринарных рисков, а также в случае возникновения форс-мажорных ситуаций [1].

2. **Оптимизация методики расчета количества исследований для формирования Плана мониторинга.** Для проведения мониторинговых исследований расчет минимально необходимого количества проб осуществляется с использованием программы Евросоюза, размещенной на веб-сайте: http://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/pesticide_residues/index_en.htm [13].

Данная программа при введении данных о количестве поголовья и произведенной продукции автоматически производит расчет минимально необходимого количества проб/исследований по каждому виду исследуемой продукции и показателям безопасности (табл. 2). В программе приведено процентное соотношение по каждой группе показателей для расчета количества исследований.

2.1. **Расчет количества химических и радиологических исследований продукции.** Расчет количества хими-

ческих и радиологических исследований биоматериала, продукции животного происхождения и кормов осуществляется с использованием программы Евросоюза *plantemplate.xls* [13], в которую вносятся цифровые показатели количества забиваемых животных или объема произведенной за год продукции. После внесения необходимой информации программа автоматически рассчитывает минимальное количество образцов, которое следует отобрать на все виды исследований по группам «А» и «В».

2.2. **Расчет количества микробиологических исследований биоматериала, продукции животного происхождения.** Основным критерием требований документов является отсутствие в продовольственном сырье микроорганизмов или их токсинов и метаболитов в количестве, которые представляют недопустимый риск для здоровья человека. Методика расчета основана на рекомендациях Комиссии Кодекс Алиментариус, изложенных в «Принципах и методических указаниях, касающихся проведения оценки микробиологического анализа» САС/GL-30 (1999), и директив Евросоюза (Приложение II) [4, 8].

Критерии расчета плана продукции по микробиологическим показателям. При разработке ежегодных планов мониторинга по микробиологическим показателям в обязательном порядке оцениваются риски загрязнения биологического происхождения.

Оценка рисков определяется при разработке Плана мониторинга с учетом нормативных документов.

По каждому субъекту РФ за прошедший год определяют:

- количество животных по видам;
- процент выявленных в прошедшем году животных, больных сальмонеллезом и листериозом;
- количество полученных в прошедшем году положительных результатов по каждому виду исследуемых микроорганизмов, в каждом виде продукции.

Пример расчета. В регионе имеется 10 млн голов. За прошедший год выявлено больных сальмонеллезом животных 0,1 млн голов, т.е. превалентность (р) составляет 1%:

$$p = \frac{\text{количество больных животных}}{\text{количество восприимчивых животных}} \times 100\% = 1\%$$

Количество требуемых для анализа образцов рассчитывается по следующим критериям: при наличии превалентности 1% и подтверждающего уровня 95%. Расчет количества образцов для выявления болезни проводится по формуле:

$$n = \frac{\log(1-c)}{\log(1-p)}$$

В нашем примере $c = 95\% = 0,95$, $p = 1\% = 0,01$, тогда:

$$n = \frac{\log(1-0,95)}{\log(1-0,01)} = \frac{\log 0,05}{\log 0,99} = \frac{-1,301029}{-0,004364} = 300 \text{ проб}$$

Таблица 2
Программа расчета минимального количества исследований для реализации Плана пищевого мониторинга

GROUP OF SUBSTANCES TO BE MONITORED	NUMBER OF SAMPLES				COMPOUND or MARKER RESIDUE	MATRIX ANALYSED	SCREENING METHOD	CONFIRMATORY METHOD	SCREENING METHOD DETECTION LIMIT (µg/kg)	CONFIRM. METHOD DETECTION LIMIT (µg/kg)	LEVEL concentration result comp.
	FARM	SLUGHTHOUSE	TOTAL	TOTAL							
	MON	RBN	SEN	PLAN							
01	4406,3	4406,3	8813								
02	4406,3	4406,3	8813								
03	4406,3	4406,3	8813								
04	4406,3	4406,3	8813								

Таблица 3
Количество образцов, требуемых для обнаружения по крайней мере одного несоответствия с уровнем достоверности 90, 95 и 99% в продукте (корме) с известным несоблюдением соответствия

Превалентность несоответствия (% в популяции, продукте)	Минимальное количество образцов, требуемых для выявления несоответствующего результата		
	90%	95%	99%
35	6	7	11
30	7	9	13
25	9	11	17
20	11	14	21
15	15	19	29
10	22	29	44
5	45	59	90
1	230	299	459
0,5	460	598	919
0,1	2302	2995	4603

Таким образом, с предприятия с уровнем превалентности 1% необходимо в год отобрать 300 проб продукции для исследования на сальмонеллез. Аналогичный расчет проводили по каждому предприятию.

Расчеты можно также провести по проценту выявления микроорганизмов данного вида в контролируемом продукте животного происхождения по результатам ветсанэкспертизы или по данным годового отчета по каждому субъекту РФ по форме 4-вет (годовая).

Например, на территории контролируемого субъекта 100 пищевых предприятий. В предыдущем году при проведении мониторинга в говядине были выявлены микроорганизмы КМАФАнМ в 1,5% случаев. Необходимо от каждого предприятия отобрать по 5 проб в год (100x5), т.е. всего 500 проб для исследования на микроорганизмы этой группы.

Для расчета плана мониторинга импортной продукции по микробиологическим показателям учитываются следующие данные по каждой зарубежной стране:

- количество предприятий, поставляющих мясо говядину;
- количество предприятий, поставляющих мясо свиней;
- количество предприятий, поставляющих мясо овец и коз;
- количество предприятий, поставляющих мясо лошадей;
- количество предприятий, поставляющих мясо кроликов;
- количество предприятий, поставляющих продукцию аквакультуры;
- количество предприятий, поставляющих продукцию нерыбных объектов промысла;
- количество предприятий, поставляющих молоко и молочную продукцию;
- количество предприятий, поставляющих мед и продукцию пчеловодства;
- количество предприятий, поставляющих пищевое яйцо.

При формировании Плана мониторинга предусматривают однократный отбор 5 проб с каждого пред-

приятия, поставляющего продукцию без нарушения ветеринарно-санитарных требований РФ, и проводят исследования на каждый микробиологический показатель, требуемый для данного вида продукции. С предприятий, поставляющих продукцию на территорию РФ с нарушениями, планируют для отбора удвоенное количество образцов продукции (по 10 проб).

Например: Всего в предыдущем году из Германии в Россию была поставлена говядина из 12 предприятий, из них продукция 2 предприятий поставлялась с нарушениями.

1 пример. Германия. Расчет по предприятиям, продукция которых поставлялась без нарушений. Например, в предыдущий год говядина поставлялась из 10 предприятий без нарушений. В план на следующий год включаются исследования по 5 проб из указанных 10 предприятий: на наличие сальмонелл, листерий, КМАФАнМ и БГКП (10 предприятий x 5 проб x 4 микроорганизма) — всего 200 исследований.

2 пример. Германия. Расчет по предприятиям, продукция из которых поставлялась с нарушениями. Говядину из 2 предприятий ввозили с нарушениями. Из 1 предприятия в продукции выявляли КМАФАнМ, из другого — БГКП. В план мониторинга на следующий год включаются удвоенные исследования продукции (по 10 проб) с указанных 2 предприятий: на наличие КМАФАнМ — 10 исследований (1 предприятие по 10 проб); БГКП — 10 исследований (1 предприятие по 10 проб).

При выявлении в продукции предприятия недопустимого количества микроорганизмов предприятие подвергается усиленному контролю за счет средств владельца продукции. В случае выявления исследуемого показателя безопасности при усиленном лабораторном контроле на предприятии могут вводиться временные ограничения по поставкам продукции.

При наличии по предыдущему году сведений об уровне превалентности по каждой стране и по каждому виду продукции, поступающей на территорию РФ, расчеты рекомендуется проводить с учетом оценки риска по уровню выявленных несоответствий.

2.3. Расчет количества химических, радиологических и микробиологических исследований кормов. Корма должны отвечать принятым стандартам качества и безопасности. Для выявления опасных факторов в кормах предприятия осуществляют контроль применения надлежащей производственной практики путем анализа опасных факторов, в том числе потенциальных источников возможного загрязнения [7].

Мониторинговые исследования кормов проводят с целью обеспечения условий безопасного производства, транспортировки и хранения кормов, кормления всех видов животных, в том числе и животных, используемых для получения пищевых продуктов для человека (продуктивных) [9].

Мониторинг ингредиентов кормов включает выборочную проверку и анализ на запрещенные и вредные вещества, основанный на подходе с позиций риска. Ингредиенты кормов должны соответствовать стандартам, лимитирующим уровни патогенов, микотоксинов и пестицидов, потенциально угрожающих здоровью животных, а через продукцию — и человеку.

Критерии расчета мониторинговых исследований кормов. Расчет количества требуемых исследований кормов и кормовых добавок по каждому показателю безопасности проводят, используя Руководство Комиссии Кодекс Алиментариус по разработке и реализации

нормативных программ обеспечения безопасности пищевых продуктов, связанных с использованием ветеринарных лекарственных средств на животных САС/GL 71-2009 [3].

В этом случае для расчета Плана мониторинга необходимо иметь следующие исходные данные за предыдущий год:

1. Перечень и объемы производства всех видов кормов на территории субъекта РФ, подвергаемого мониторингу.

2. Превалентность несоответствий, выявленных по результатам исследований в предыдущем году по каждому виду корма.

Имея упомянутые данные, расчет объема выборки проб осуществляют, используя данные табл. 3.

Пример расчета. Уровень достоверности 95%. Комбикорм для птицы. Если в предыдущем году при исследовании в этом виде продукции выявлено 5% несоответствий (превалентность 5%), то для достоверного выявления несоответствия необходимо отобрать и исследовать не менее 59 образцов комбикорма. Из них 50% (29) проб исследовать на показатели безопасности группы «А» и 50% — группы «В». Таким же образом расчеты вести и по другим видам продукции.

Данную таблицу рекомендуется также использовать при расчетах обоснованного количества проб в кормоцехах, на фермах от убойной птицы, если имеются данные по превалентности несоответствий по кормам этой птицефермы за предыдущий год. В случае отсутствия данных по превалентности несоответствий необходимо планировать следующий расчет отбора проб.

При расчете учитывают каждое предприятие по производству кормов, включая кормоцеха в животноводческих хозяйствах и хозяйства всех форм собственности. От каждого предприятия отбирают не менее 10 проб кормов и проводят их исследование на показатели безопасности в соответствии с ранее определенной степенью риска. Растительные корма, произведенные в хозяйствах, исследуют на содержание остатков химических удобрений, пестицидов, химических элементов, микотоксинов, растительных ядов и др.

Микроорганизмы неравномерно распределены в кормах, в связи с чем возникает неуверенность в том, что средний образец может охарактеризовать всю партию. Поэтому для характеристики партии по микробиологическим показателям обычно не составляют среднюю пробу, а отбирают и исследуют точечные пробы (n). Как правило, отбирают не менее 5 проб и каждую пробу исследуют на каждый показатель безопасности.

При подготовке Плана мониторинга кормов по микробиологическим показателям предусматривают однократный отбор не менее 5 проб от всех видов кормов и от всех предприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа нормативных документов РФ и ЕС, научной литературы по оценке безопасности пищевой продукции и сырья и данных, представленных в настоящей статье, было оформлено и утверждено в установленном порядке «Положение по разработке плана государственного ветеринарного лабораторного мониторинга остатков запрещенных и вредных

веществ в организме живых животных, продуктах животного происхождения и кормах». Основные принципы этого документа гармонизированы с системой, принятой в ЕС, а также основаны на значительном отечественном опыте ветеринарного контроля показателей безопасности пищевых продуктов и кормов. План мониторинга разработан с учетом национальных особенностей применения в Российской Федерации ветеринарных лекарственных препаратов, пестицидов, агрохимикатов, а также с учетом полученных в предыдущие годы положительных результатов.

Для обеспечения усиленного мониторинга безопасности продукции в рамках Плана мониторинга выделена подпрограмма мониторинга антибиотиков с применением арбитражных методов их контроля и подтверждения положительных результатов скрининговых исследований, полученных в других лабораториях (идентификация риска).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранников В.Д., Кириллов Н.К. Экологическая безопасность сельскохозяйственной продукции. — М.: Колос, 2005. — 352 с.
2. Директива Совета 96/23/ЕС от 29 апреля 1996 года. — URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/laws/eu/96-23.pdf>.
3. Кодекс Алиментариус. Общий стандарт по contaminants and toxins in foodstuffs and feeds (CODEX STAN 193-1995). — URL: <http://dokipedia.ru/document/5197124>.
4. Кодекс Алиментариус. Производство продуктов животноводства: пер. с англ. / ФАО/ВОЗ. — М.: Весь мир, 2007. — 230 с.
5. Контроль качества молочной продукции по жирнокислотному составу / С.А. Дунин, Ю.В. Пивоваров, В.А. Зенин, О.В. Вьюнсковская // Контроль качества продукции. — 2012. — № 5. — С. 18–23.
6. Микробиологический анализ мяса, мяса птицы и яйцепродуктов: пер. с англ. / ред. Дж.К. Мид. — СПб.: Профессия, 2008. — 384 с.
7. Правила бактериологического исследования кормов: утв. ГУВ МСХ СССР 10.06.1975. — М., 1976. — 12 с.
8. Принципы и методические указания, касающиеся проведения оценки микробиологического риска (САС/GL 30 (1999)). — 15 с.
9. Продовольственная безопасность России и ведущих стран мира: аналит. обзор / Э.Л. Аронов, Т.П. Нино, Т.А. Суркова [и др.]; М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации, Федер. агентство по сел. хоз-ву. — М.: Росинформагротех, 2005. — 124 с.
10. Регламент (ЕС) № 470/2009 Европейского парламента и Совета от 06 мая 2009 г. — 19 с.
11. СанПин 2.3.2.1078–01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. — М.: Госстандарт России, 2002. — 246 с.
12. ТР ТС 024/2011. Технический регламент на масложировую продукцию: утв. Комиссией Таможенного союза 09.12.2011 г. № 883. — 37 с.
13. Pesticide Residues. — URL: http://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/pesticide_residues/index_en.htm.
14. WHO/FAO. Report of a Joint WHO/FAO Consultation N 61: Biotechnology and food safety. — WHO/FAO, 1996. — 29 p.

BASIC PRINCIPLES OF PLANNING ANIMAL PRODUCT NATIONAL VETERINARY MONITORING

O.I. Ruchnova¹, O.V. Pruntova², D.A. Lozovoy³

¹ Leading Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: ruchnova@arriah.ru

² Head of Testing Centre, Doctor of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ Director, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lozovoy@arriah.ru

SUMMARY

The paper presents the results of basic parameter selection and optimization of sample quantity calculation method for chemical (banned and harmful substance residues), microbiological and radiological tests carried out annually within the Plan of National Veterinary Laboratory Monitoring of Banned and Harmful Substances and Residues Thereof in Live Animals, Animal Products and Feeds in the RF by the Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAH»).

Key words: monitoring, chemical, microbiological, radiological parameters, food products, contaminants.

INTRODUCTION

In the context of Russia's accession to the World Trade Organization (WTO) the RF reports to the appropriate international organizations on national quality and safety control of domestic food products, primary animal products, and animal and plant products [4, 14].

One of the major elements in the system of food safety national control is the National Veterinary Laboratory Monitoring of Banned and Harmful Substances and Residues Thereof in Live Animals, Animal Products and Feeds in the RF. Monitoring of animal product and feed safety in the RF as well as in the European Union countries is planned in accordance with the provisions of Council Directive 96/23/EC of April 29, 1996 on measures to monitor banned and harmful substances and residues thereof in live animals and animal products [2, 10], and is based on the Concept of National Veterinary Laboratory Monitoring of Banned and Harmful Substances and Residues Thereof in Live Animals, Animal Products and Feeds in the RF for 2008 and onwards, approved by Head of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance S.A. Dankvert on May 5, 2008 and taking into account national peculiarities and traditions, obligatory control of drugs and xenobiotics as well as transition period and harmonization of the RF legislation with the EU's one [11, 12].

Notwithstanding the fact that the list of product safety parameters subject to laboratory testing is determined by

the appropriate regulatory acts, there are a lot of factors facilitating the probability of banned and harmful substance presence in controlled objects [3, 4]. Such factors include national peculiarities and traditions, epidemic situation in individual regions and probable use of different drugs and xenobiotics, including those which are banned in the RF. [9]. In this context the differentiated approach to testing of the most informative safety parameters in different RF regions is needed as well as the improvement of the method recommended by the EU Commission for the calculation of minimum sample quantity needed for monitoring tests [13].

The target of this study was to determine the basic principles used for the selection of animal product safety parameters (chemical, radiological and microbiological), to optimize the method used for calculation of test number and needed for the development of the Plan of National Veterinary Laboratory Monitoring of Banned and Harmful Substances and Residues Thereof in Live Animals, Animal Products and Feeds in the RF (Monitoring Plan).

MATERIALS AND METHODS

Tested objects. The monitored objects are farmed and wild animals, animal products and feeds produced in the Russian Federation (RF), Customs Union (CU) and imported products.

Table 1
Residue or substance group to be detected by type of animal, their feedingstuffs, including drinking water, and primary animal products

No	Type of animal, animal products, feeds Substance Group	Bovine, ovine, caprine, porcine, equine animals	Poultry	Aquaculture animals	Milk and dairy products	Eggs	Rabbit meat and the meat of wild game and farmed game	Honey	Feeds and feed additives
1	A1	X	X	X			X		X
2	A2	X	X				X		X
3	A3	X	X	X			X		
4	A4	X	X				X		
5	A5	X	X				X		X
6	A6	X	X	X	X	X	X		X
7	B1	X	X	X	X	X	X	X	X
8	B2a	X	X	X	X		X		X
9	B2b	X	X			X	X		X
10	B2c	X	X				X	X	X
11	B2d	X							
12	B2e	X	X		X		X		
13	B2f								X
14	B3a	X	X	X	X	X	X	X	X
15	B3b	X			X			X	X
16	B3c	X	X	X	X		X	X	X
17	B3d	X	X	X	X				X
18	B3e			X					
19	B3f								X
20	Adulteration*				X				

* Adulteration of products is adding certain foreign matters into food products (honey, meat, milk and etc.) thus changing their quality and value. Adulterated products are not allowed to be used. Adulterated products are subject to constant control in the RF within meat inspection and special monitoring programs (phosphates, soy presence and etc.) [6]. Currently special attention is given to testing of food products for preservatives, fish for histamine and milk products for adulteration with plant oils (fatty acid content) [5].

Parameter groups. Based on the accepted classification and the provisions of Council Directive 96/23/EC the controlled contaminants are divided into several groups [2].

GROUP «A» – Substances having anabolic effect and unauthorized substances

(A1) Stilbenes, stilbene derivatives, and their salts and esters

(A2) Antithyroid agents

(A3) Steroids

(A4) Resorcylic acid lactones including zeranol

(A5) Beta-agonists

(A6) Compounds included in Annex IV to Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 (chloramphenicol, nitrofurans and metabolites thereof, nitroimidazoles) [10]

GROUP «B» – Veterinary drugs and contaminants

(B1) Antibacterial substances, including sulphonamides, quinolones

(B2) Other veterinary drugs:

(a) Anthelmintics

(b) Anticoccidials

(c) Carbamates and pyrethroids

(d) Sedatives

(e) Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

(f) Other pharmacologically active substances

(B3) Other substances and environmental contaminants

(a) Organochlorine compounds including PCBs, dioxins;

(b) Organophosphorus compounds

(c) Chemical elements: mercury, lead, cadmium, arsenic (for primary products); mercury, lead, cadmium, arsenic,

copper, zinc, ferrum, stibium, nickel, selenium, chrome, fluorine, molybdenum, cobalt (for feeds and feed additives);
 (d) Mycotoxins
 (e) Dyes

(f) Other substances including unpatented drugs, pesticides, biotoxins and radionuclides (sum of PAHs including benz(a)pyren, nitrosamines, phycotoxins (ASP, DSP, PSP), 2,4-D acid, salts and esters thereof, histamine, hydroxymethylfurfural (Table 1).

Microbiological parameters include pathogenic and opportunistic microorganisms:

- (1) number of mesophilic aerobic and facultatively anaerobic microorganisms / total viable count (TVC);
- (2) *Coliforms*/ enteropathogenic types of *E. coli*/ toxin producing bacteria;
- (3) *Salmonella*;
- (4) *Listeria monocytogenes*;
- (5) *Vibrio parahaemolyticus*;
- (6) *Clostridium* (sulphite reducing clostridia);
- (7) *Staphylococcus* (*S. aureus*);
- (8) *Proteus*.

Methods for calculating minimum required sample quantity. Minimum sample quantity required for monitoring is determined using the EU programme published on web-site: http://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/pesticide_residues/index_en.htm [13]. Entering data on the number of animals and manufactured products this programme automatically calculates minimum required sample/test quantity for each type of tested products and

safety parameters. The programme gives proportion per each group of parameters for calculating the test quantity.

RESULTS AND DISCUSSION

1. General provisions for planning and arranging food safety monitoring activities. Territorial Administrations of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, to whom the FGBI «ARRIAH» renders services, are in charge of product safety control and sampling in the regions for the purpose of Monitoring Plan implementation. The Rosselkhoznadzor Order On Laboratory Tests within the Rosselkhoznadzor Measures Taken to Comply with WTO SPS Agreement at the RF Accession to the WTO assigns the following RF Subjects to the FGBI «ARRIAH»:

- Rosselkhoznadzor Territorial Administration for Vladimir Oblast;
- Rosselkhoznadzor Territorial Administration for Kostroma and Ivanovo Oblasts;
- entire Russian Federation, when necessary.

Laboratory tests compliant with the Food Safety Monitoring Plan are performed in the RF using federal funds.

For each subsequent year the FGBI «ARRIAH» Department for Research Coordination develops the Monitoring Plan in November of the current year using previous year monitoring results for calculations. To perform this task the Department for Research Coordination requests the assigned Rosselkhoznadzor Territorial Administrations to submit the following information by November 1 of the

current year: number of farms, number of kept and slaughtered animals for the previous year, (for all productive animal species), number of fish hatcheries and fish harvesting ponds, apiaries, rabbit farms, poultry farms and processing plants, as well as the amount of animal product and feed manufacture (including number of establishments producing animal products by types of products and feeds), a list of veterinary drugs used for prevention of animal diseases, and a list of used pesticides.

The Monitoring Plan for the next year including data on the required test quantity for each product type and each RF Subject as well as the amount of money required for implementing the Monitoring Plan are submitted to the Rosselkhoznadzor in December each year for consideration and approval in due order. The project is also published in FGIS «ASSOL» in «Monitoring Plan» section. In January next year the Rosselkhoznadzor Central Office informs the FGBI «ARRIAH» about the fact that the Monitoring Plan was approved.

The Research Coordination Department, not later than the 1st of March current year, makes a tripartite Agreement on Cooperation (FGBI «ARRIAH», Rosselkhoznadzor Territorial Administration, Veterinary Authority of the RF subject) in which the Monitoring Plan criteria for the next year are indicated. Reports on the Monitoring Plan results for the previous year are sent to the FGBI «Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory» by the 1st of February of the year following the reporting period.

The Monitoring Plan can be amended throughout a year due to detected veterinary risks as well as force majeure events [1].

2. Optimization of test quantity calculation methods for the Monitoring Plan development. Minimum required sample quantity for monitoring tests is calculated using the EU programme published on the web site: http://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/pesticide_residues/index_en.htm [13].

On entering data on the number of animals and manufactured products this programme automatically calculates minimum required sample/test quantity for each type of tested products and safety parameters (Table 2). The programme gives proportion per each group of parameters for calculating test quantity.

2.1. Calculating quantity of chemical and radiological product tests. Quantity of chemical and radiological tests of biomaterials as well as products of animal origin and feeds is calculated using the EU programme *plant-emplate.xls* [13], where numeric values of the number of slaughtered animals and manufactured products a year are entered. On entering the required information the programme automatically calculates the minimum sample quantity to be collected for each type of test by Groups «A» and «B».

2.2. Calculating quantity of microbiological tests of biomaterials and products of animal origin. The main criteria indicated in the documents is absence of microorganisms, their toxins or metabolites in primary food products in quantities, posing risk to human health. Calculation methods are based on recommendation of Codex Alimentarius Commission «Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment» CAC/GL-30 (1999) and the EU Directives (Annex II) [4, 8].

Criteria for product monitoring plan calculation by microbiological parameters. Development of annual Monitoring Plans by microbiological parameters envisages assessment of risks of biological contamination.

Risk assessment is planned in compliance with regulatory documents. The following criteria are determined for each RF Subject for the previous year:

- number of animals by species;
- rate of *Salmonella* and *Listeria* infected animals detected previous year;
- number of positives obtained previous year by each type of tested microorganisms in each product type.

Calculation example. There are 10 million animals in the region. Last year there were detected 0.1 million of *Salmonella* infected animals, i.e. prevalence (p) is 1%:

$$p = \frac{\text{number of diseased animals}}{\text{number of susceptible animals}} \times 100\% = 1\%$$

Required sample quantity is calculated basing on the following criteria: 1% prevalence and 95% confirmation level. Sample quantity calculation for disease detection is performed according to the formula:

$$n = \frac{\log(1-c)}{\log(1-p)}$$

c = 95% = 0,95, p = 1% = 0,01, then:

$$n = \frac{\log(1-0,95)}{\log(1-0,01)} = \frac{\log 0,05}{\log 0,99} = \frac{-1,301029}{-0,004364} = 300 \text{ samples}$$

So, 300 product samples shall be collected from an establishment with 1% prevalence for *Salmonella* tests. Similar calculations were performed for each establishment.

Microorganism detection rate in a controlled animal product can be calculated basing on veterinary and sanitary inspection results and on annual report data for each RF subject according to 4-vet form (annual).

For instance, there are 100 food producing establishments in the controlled subject. Previous year monitoring revealed TVC in beef in 1.5% cases. It is necessary to collect 5 samples a year (100x5) from each establishment i.e. 500 samples for testing microorganisms belonging to this group.

For calculations by microbiological parameters related to imported product monitoring plan it is necessary to take into account the following data on each foreign country:

- number of beef exporting establishments;
- number of pork exporting establishments;
- number of establishments, exporting sheep and goat meat;
- number of establishments, exporting horse meat;
- number of establishments exporting rabbit meat;
- number of establishments exporting aquaculture products;
- number of establishments exporting non-fin fish products;
- number of establishments exporting milk and dairy products;
- number of establishments exporting honey and apicultural products;
- number of establishments exporting table eggs.

When establishing the Monitoring plan 5 samples shall be collected once at each supplying establishment not violating the RF veterinary and sanitary requirements and the samples shall be tested for the microbiological parameters required for this type of product. In case of the establishments exporting their products to the Russian Federation

Table 2
Programme for calculating minimum required test quantity for Food Monitoring Plan implementation

Table 3
Number of samples required for the detection of at least one nonconformity with 90, 95 and 99% confidence level in products (feed) with known nonconformity

Prevalence of nonconformity (% in population, product)	Minimal number of samples required for nonconformity detection		
	90%	95%	99%
35	6	7	11
30	7	9	13
25	9	11	17
20	11	14	21
15	15	19	29
10	22	29	44
5	45	59	90
1	230	299	459
0,5	460	598	919
0,1	2302	2995	4603

with violations a doubled number of product samples is required (10 samples per establishment).

Example: last year Russia imported products from 12 German establishments, 2 of them violated the requirements during export.

Example 1. Germany. Calculation for the establishments, exporting their products without violations. For example, last year beef was exported from 10 establishments without any violations. The next year monitoring plan suggests that 5 samples shall be collected from each of the 10 establishments and tested for *Salmonella*, *Listeria*, TVC and Coliforms (10 establishments×5 samples×4 microorganisms) – that is 200 tests in total.

Example 2. Germany. Calculation for the establishments exporting their products with violations. Beef from 2 establishments was exported with violations. Excess in TVC was detected in the products exported from the first establishment and in Coliforms from the other one. For the next year the Monitoring plan suggests a doubled number of samples from these two establishments (10 samples per establishment): for TVC – 10 tests (10 samples from the corresponding establishment); Coliforms – 10 tests (10 samples from the corresponding establishment).

In case TVC is above the admissible level the establishment is subject to enhanced monitoring at the expense of the product owner. In case the safety parameter of concern is detected during the enhanced laboratory control temporary restrictions may be imposed on products exported from this establishment.

In case the last year prevalence data by each country and each product type exported to the Russian Federation is available, calculations should be made taking into account risk assessment in regards to the detected nonconformity levels.

2.3. Calculation of the number of feed samples to be tested for chemical, radiological and microbiological parameters. Feeds must meet approved safety and quality standards. To detect harmful substances in feed the establishment performs GMP implementation control by analyzing haz-

ardous factors, including potential sources of contamination [7].

Feed monitoring tests are performed to ensure safe production, transportation and storage of feeds, as well as safe feeding of all animal species, including of those used in the production of food products intended for human consumption (productive animals) [9].

Feed ingredient monitoring includes random checking and testing for banned and harmful substances based on the risk analysis. Feed ingredients must meet standards limiting the levels of pathogens, mycotoxins and pesticides posing a potential threat to animal health and, via the food products, to humans.

Calculation criteria for feed monitoring tests. The number of feeds and feed additive tests by each safety parameter is calculated using the Codex Alimentarius Commission Guidelines for the design and implementation of National regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals CAC/GL 71-2009 [3].

In this case to calculate the Monitoring plan one shall have the following data on the previous year:

1. List and volume of all types of feeds subject to monitoring, produced in the Subject of the Russian Federation.
2. Prevalence of nonconformities by each feed type detected during the previous year.

In case the abovementioned data is available, the sample size is calculated using data from Table 3.

Calculation example. 95% confidence level. Mixed feed for poultry. In case 5% of nonconformities were detected in this type of product during the previous year (5% prevalence), at least 59 samples of mixed feed shall be taken and tested for the reliable detection of nonconformities. 50% of this number (29 samples) shall be tested for group «A» safety parameters, another 50% - for group «B» parameters. Calculations for other types of products are made in the same way.

The table should also be used when calculating the justified number of samples from slaughter poultry at feed-

processing rooms, on farms, in case the last year data on the prevalence of feed nonconformities on this farm is available.

When making a calculation, every establishment producing feeds, including feed-processing rooms on farms, and farms of all forms of ownership, shall be taken into account. At least 10 feed samples shall be collected at each establishment and tested for safety parameters in accordance with the previously determined risk level. Vegetable feeds produced on farms shall be tested for the residues of agricultural fertilizers, pesticides, chemical elements, mycotoxins, plant toxins, etc.

Microorganisms are spread in feeds unevenly, thus, raising concerns that the pooled sample could be representative of the whole batch. That is why to tests the batch for microbiological parameters random samples (n) shall be used rather than the pooled ones. Normally at least 5 samples are taken and each sample is tested for each safety parameter.

When developing a feed microbiology monitoring plan at least 5 samples shall be taken once from all the feed types and at every establishment.

CONCLUSION

Based on the analysis of the RF and EU regulatory documents, scientific literature on food and primary product safety assessment and data provided in this paper, «Regulation on the development of the Plan of National Veterinary Laboratory Monitoring of Banned and Harmful Substances and Residues Thereof in Live Animals, Animal Products and Feeds in the RF» was worked out and approved. The basic principles of this document are harmonized with the system adopted in the EU and are based on the considerable national experience in veterinary control of food and feed safety. The Monitoring plan is designed taking into account national peculiarities of veterinary drug, pesticide and agrochemical use in the Russian Federation, as well as positive results obtained in previous years.

As for the enhanced food safety monitoring, there is an antibiotic monitoring subprogram within the Monitoring plan. The subprogram is performed using reference methods for antibiotic control and for the confirmation of posi-

tive screening test results obtained in other laboratories (risk identification).

REFERENCES

1. Barannikov V.D., Kirillov N.K. Ecological safety of agricultural products. – M.: Kolos, 2005. – 352 p.
2. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/laws/eu/96-23.pdf>.
3. Codex Alimentarius. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (CODEX STAN 193-1995). – URL: <http://dokipedia.ru/document/5197124>.
4. Codex Alimentarius. Animal food production : transl. from Eng./ FAO/WHO. – M.: Ves Mir, 2007. – 230 p.
5. Dairy product quality control by fatty acid composition / S.A. Dunin, U.V. Pivovarov, V.A. Zenin, O.V. Vjunovskaya // Product Quality Control. – 2012. – № 5. – P. 18–23.
6. Microbiological testing of meat, poultry meat and egg products: transl. from eng. / ed. J.K. Mid. – SPb.: Professiya, 2008. – 384 p.
7. Rules for bacteriological testing of feeds: approved by the Main Veterinary Department of the Ministry of Agriculture of the USSR on 10.06.1975. – M., 1976. – 12 p.
8. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment (CAC/GL 30 (1999)). – 15 p.
9. Food safety in Russia and other leading countries: analytical review / E.L. Aronov, T.P. Nino, T.A. Surkova [et al.]; Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Federal Agriculture Agency. – M.: Posinformagrotech, 2005. – 124 p.
10. Regulation (EC) № 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 – 19 p.
11. SanPin 2.3.2.1078-01. The Hygienic Requirements for Foodstuff Safety and Nutritional Value. – M.: Gosstandart Rossiya, 2002. – 246 p.
12. TR CU 024/2011. Technical regulation on oil and fat products: approved by the CU Commission on 09.12.2011 № 883 – 37 p.
13. Pesticide Residues. – URL: http://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/pesticide_residues/index_en.htm.
14. WHO/FAO. Report of a Joint WHO/FAO Consultation N 61: Biotechnology and food safety. – WHO/FAO, 1996. – 29 p.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАЛЬСИФИКАЦИИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ И РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ ПО ЖИРНОКИСЛОТНОМУ СОСТАВУ

Д.С. Большаков¹, Д.В. Юдина², Т.Б. Никешина³

¹ старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² ведущий технолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yudina@arriah.ru

³ заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир, e-mail: nikeshina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В работе представлена усовершенствованная методика определения жирнокислотного состава молочной и растительной продукции, которая позволяет выявлять фальсификацию растительного масла, молока и молочных продуктов.

Ключевые слова: жирнокислотный состав, фальсификация, молочная продукция, растительное масло, газовая хроматография.

DETERMINATION OF ADULTERATIONS IN DAIRY PRODUCTS AND VEGETABLE OILS BASED ON THEIR FATTY ACID COMPOSITIONS

D.S. Bolshakov¹, D.V. Yudina², T.B. Nikeshina³

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² Leading Technologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yudina@arriah.ru

³ Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nikeshina@arriah.ru

SUMMARY

Improved method for determination of fatty acid compositions of dairy and plant products that allows detection of adulterations in vegetable oils, milk and dairy products is described in the paper.

Key words: fatty acid composition, adulteration, dairy products, vegetable oil, gas chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

Современный рынок предлагает потребителю широкий выбор отечественных и импортных продовольственных товаров. Не секрет, что значительное расширение ассортимента продуктов питания на потребительском рынке не обходится без стремления выпускать под видом известных товарных марок явные подделки или продукцию заведомо заниженного качества. Одним из видов подделки масложировой и молочной продукции является замена молочных жиров продуктами немолочного происхождения, например, растительными жирами. Фальсификация растительного масла главным образом заключается в подмене или разбавлении дорогих сортов более дешевыми (например, разбавление оливкового масла рапсовым). Для выявления подобных случаев используют следующие приемы:

- определение жирнокислотного состава (массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот) растительного масла и животных жиров;
- обнаружение растительных жиров в жировой фазе молока и молочных продуктов по анализу стеринной фракции;
- определение триглицеридного состава жировой фазы продукта;
- определение *транс*-изомеров жирных кислот жировой фазы продукта.

Одним из наиболее эффективных методов выявления фальсификации молочных и растительных продуктов является определение их жирнокислотного состава (ЖКС) и последующее сопоставление его с табличным, стандартным составом, приведенным в нормативной документации (НД). Основными требованиями, предъявляемыми к методам определения жирных кислот (ЖК), являются высокая чувствительность, селективность и достоверность полученных результатов. Для определения ЖКС молочной и растительной продукции используют методы спектрального анализа (ИК-спектроскопия, ядерный магнитный резонанс) [17, 18], но наиболее достоверными являются хроматографические методы: тонкослойная (ТСХ) [25], газовая (ГХ) [25], высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [20]. Заключение о соответствии/несоответствии анализируемого образца проводят путем сопоставления полученных результатов с регламентируемым составом конкретных видов продукции, приведенным в НД [2–4, 8].

Качество молочной продукции характеризуется и составом стеринной фракции, который устанавливают хроматографическими методами [7, 19, 26]. Состав стеринной фракции четко зависит от природы жира (животного или растительного происхождения). При использовании исключительно молочного жира в стеринной фракции должен находиться только холестерин. В растительных жирах холестерина практически нет, но присутствуют другие стерины, а именно: брасикастерин, кампастерин, стигмастерин, β-ситостерин и т.д. Определение фальсификации продукции по составу стеринной фракции (а именно по содержанию растительных стерин) является наиболее достоверным методом, который позволяет выявить добавки масел растительного происхождения от 2% и выше. При этом на хроматограмме фиксируют пики фитостерин, эти компоненты подтверждают факт фальсификации.

Хроматографические методы определения ЖКС и состава стеринной фракции могут быть взаимно

уточняющими при определении фальсификации молочной продукции.

Основным недостатком данного приема является трудоемкость анализа, связанная с осаждением стерин в виде дигитонинов и дальнейшей перекстракцией полученных производных в подходящий растворитель [7].

Альтернативным способом выявления фальсификации растительного масла и молочной продукции является определение триглицеридного состава (триацилглицеридов) жировой фазы продукта, для чего используют методы ГХ и ВЭЖХ [15, 16].

Подавляющее большинство природных жиров и масел представляют собой смесь разнокислотных триглицеридов. Триглицеридный состав жиров и масла достаточно индивидуален, и это свойство может быть использовано для предварительной идентификации масел, жиров и масложировой композиции. Однако большое число триглицеридов, из которых и состоит жировая фаза продукта, осложняет широкое использование данного подхода. Проанализировать большой спектр триглицеридов и собрать необходимое количество статистических данных затруднительно, это требует больших временных затрат и использования дорогостоящего оборудования (ВЭЖХ-МС) [15, 16].

Определение фальсификации по нескольким наиболее характерным триглицеридам намного упрощает методологию анализа, но может быть использовано главным образом для растительных жиров [15]. В связи с этим определение триглицеридного состава жировой фазы для выявления несоответствующей продукции не получило столь широкого распространения. На территории Российской Федерации определение триглицеридного состава стандартизовано только для анализа заменителей какао-масла [1], для оценки содержания эквивалентов масла какао в масле какао и шоколаде методом ГХ-ПИД [9, 10].

Для фальсификации молочной продукции наиболее часто используют гидрированные жиры или смеси с другими маслами, применение которых должно быть ограничено из-за высокого содержания в них *транс*-изомеров жирных кислот (ТИЖК). ТИЖК образуются в жирах в процессе гидрогенизации, дезодорации, отбеливания и воздействия высоких температур [11]. *Транс*-жиры обладают усвояемостью, одинаковой с обычными жирами. Входя во все липидные структуры организма, например, в клеточные мембраны, *транс*-жиры нарушают транспорт веществ через них, передачу сигналов, работу рецепторов на мембранах, биохимию вспомогательных процессов.

Содержание ТИЖК на территории РФ в масложировой продукции (заменители молочного жира, маргарины, жиры специального назначения, эквиваленты и заменители масла какао) нормируется в соответствии с Техническим регламентом [13].

Однако *транс*-жиры присутствуют и в натуральных продуктах (молоко и мясо жвачных животных) в количестве от 4 до 8%. В жире молока и мяса жвачных животных преобладает один из *транс*-изомеров олеиновой кислоты C_{18:1}(t11), названный вакценовой кислотой (содержание от 0,5 до 4%), и один из *транс*-изомеров линолевой кислоты C_{18:2}(c9, t11), названный руменовской кислотой (содержание от 0,2 до 2%) [11, 12].

Для определения содержания ТИЖК применяют современные методы ИК-спектроскопии [6], капиллярной ГХ [6, 22, 24]. Ион-серебряную ТСХ [22] и ВЭЖХ [14]

обычно используют для разделения и определения транс-(C_{18:1})-изомеров в частично гидрированных маслах и молочных жирах. Возможно использование комбинированных методов: ГХ в сочетании с ТСХ и ВЭЖХ [22, 23], что, несомненно, усложняет процедуру проведения анализа.

Новые хроматографические и масс-спектрометрические методы позволяют детектировать следовые количества ТИЖК. Но остаются проблемы, связанные с перекрытием цис- и транс-изомеров, то есть с неполным отделением изомеров транс-кислот от их цис-компонентов. Нет универсальных методов определения для всех образцов масложировой продукции. Решением этих и других проблем определения ТИЖК активно занимаются в настоящее время.

Исходя из представленного обзора существующих подходов к выявлению фальсификации растительной и молочной продукции, можно сказать, что наиболее универсальным для растительных и животных жиров и проработанным с точки зрения нормативной базы является метод определения ЖКС жировой фазы продукта.

Цель данной работы заключалась в усовершенствовании методики определения жирнокислотного состава молочной и растительной продукции для выявления фальсификации растительного масла, молока и молочных продуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование: газовый хроматограф «ХРОМОС ГХ-1000» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором (ПИД), оснащенный программным пакетом для управления газовым хроматографом «ХРОМОС»; капиллярная колонка «DB-23» (Agilent Technologies, Inc, США) длиной 60 м, внутренним диаметром 0,32 мм с нанесенной фазой 50%-цианопропил-50%-метилполисилоксан (толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм); весы лабораторные Ohaus Pioneer PA 214C специального класса точности с ценой деления 0,1 мг, наибольшим пределом взвешивания 210 г; весы лабораторные электронные Ohaus SP-202 Scout Pro Balance высокого класса точности с ценой деления 0,01 г, наибольшим пределом взвешивания 200 г; микродозаторы Biohit с переменным объемом 10–100, 100–1000, 1000–5000 мкл и пределом допускаемой погрешности измерения не более ±2%; центрифуга лабораторная MiniSpin; центрифуга лабораторная медицинская «ОПн-3м»; центрифуга лабораторная MPW-260R; баня водяная (термальная ванна) BW-0510H Lab Companion.

Химическая посуда и материалы: пробирки одноразовые (типа эппендорф) вместимостью 1,5 мл; пробирки одноразовые вместимостью 15 мл; виалы с завинчивающимися крышками вместимостью 2 мл; фильтры обеззоленные «синяя/красная лента»; микрошприц хроматографический объемом 10 мкл; колбы мерные по ГОСТ 1770-74.

Для градуировки хроматографической системы и контроля качества проводимых исследований использовали следующие стандартные образцы: состав смеси 37 метиловых эфиров жирных кислот (F.A.M.E.) Supelco (Supelco TM 37 Component FAME Mix, Catalog № 47885-U); состав растительного и животного жира Restek:

1) AOCS #1 (cat. № 35022) для анализа кукурузного, макового, хлопкового, соевого, орехового, сафлорово-

го, подсолнечного, рисового, кунжутного масла и масла отрубей;

2) AOCS #2 (cat. № 35023) для анализа периллового, конопляного масла, масла льняного семени и семян каучукового дерева;

3) AOCS #4 (cat. № 35025) для анализа оливкового, касторового масла и масла камелии;

4) AOCS #6 (cat. № 35027) для анализа сала, говяжьего или бараньего жира и пальмового масла;

5) AOCS #3 (cat. № 35024) для анализа арахисового, рапсового и горчичного масла.

Реактивы: метанол, 99,5%, Panreac; гексан, 99,5%, Panreac; гептан, 99,5%, Panreac; пентан, 99,5%, Panreac; метилат натрия, Sigma; спирт этиловый (этанол), 95% (раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм), ЗАО «Брынцалов-А».

Пробоподготовка

Растительное масло: 2–3 капли анализируемой пробы растительного масла растворяли в 1 мл гексана. Добавляли к растворенной пробе 50 мкл раствора 2 М метилата натрия в метаноле, перемешивали подготовленный образец в течение 1 мин. Затем выдерживали реакцию смесь в течение 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин, после чего проводили хроматографический анализ.

Молочные продукты, сметана, творог, сыр: жировую фазу из 1 г гомогенизированной пробы экстрагировали в 1 мл гексана в течение 10 мин при постоянном перемешивании. Для проб сыра экстракционную смесь выдерживали при температуре 80–85°C в течение 20 мин. После центрифугирования при 2700 об/мин в течение 10 мин добавляли к 950 мкл полученного супернатанта (центрифугата) 50 мкл раствора 2 М метилата натрия в метаноле. Перемешивали пробу в течение 1 мин. Затем выдерживали реакцию смесь в течение 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин, после чего проводили хроматографический анализ.

Сливочное масло: жировую фазу из 0,5 г пробы, размягченной при температуре 40–50°C, экстрагировали в 1 мл гексана в течение 10 мин при постоянном перемешивании. После центрифугирования при 2700 об/мин в течение 10 мин добавляли к 950 мкл полученного супернатанта (центрифугата) 50 мкл раствора 2 М метилата натрия в метаноле. Перемешивали пробу в течение 1 мин. Затем выдерживали реакцию смесь в течение 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин, после чего проводили хроматографический анализ.

Молоко: жировую фазу из 0,5 г (0,5 мл) пробы экстрагировали в 1 мл гексана в присутствии 0,5 мл этилового спирта (для удаления белковой фракции) при постоянном перемешивании в течение 10 мин. После центрифугирования при 2700 об/мин в течение 10 мин добавляли к 950 мкл полученного супернатанта (центрифугата) 50 мкл раствора 2 М метилата натрия в метаноле. Перемешивали пробу в течение 1 мин. Затем выдерживали реакцию смесь в течение 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин, после чего проводили хроматографический анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стандартный метод определения ЖКС основан на жидкостной экстракции липидов животного происхождения органическим растворителем, позволяющим выделить 90–95% всех клеточных липидов, концентрировании полученного экстракта и его использовании для метилирования липидных триглицеридов посредством

гидролиза с последующим переводом полученных ЖК в метиловые эфиры и хроматографическим анализом смесей методом ГХ-ПИД для выявления состава и определения массовой доли индивидуальных ЖК.

Усовершенствованная методика предполагает совмещение стадий экстракции жировой фазы и получения производных (метиловых эфиров), что позволит сделать анализ простым, экспрессным, экономичным и экологичным (за счет применения малых объемов органических растворителей). Для использования методики в рутинном анализе необходимо:

- оптимизировать условия хроматографического разделения метиловых эфиров жирных кислот жировой фазы продукта;
- оптимизировать условия пробоподготовки;
- провести контроль с использованием стандартных и контрольных образцов;
- провести анализ реальных объектов с целью выявления фальсификации.

Условия хроматографирования и градуировка хроматографической системы. Определение фальсификации молочной и растительной продукции по ЖКС основано на использовании метода внутренней нормализации (внутренней нормировки) — метода определения содержания компонента в смеси, при котором сумму каких-либо параметров, например, сумму площадей всех пиков, принимают за 100%, тогда отношение площади отдельного пика к сумме площадей при умножении на 100 будет характеризовать массовую долю (%) компонента в смеси. Данный метод не требует построения привычной градуировочной зависимости площадей анализируемых компонентов от их концентрации.

Однако градуировка хроматографической системы необходима для оценки времен элюирования метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) с целью дальнейшей правильной идентификации пиков.

Хроматографирование проводили на капиллярной колонке DB-23 при температуре испарителя 200°C, температуре детектора 240°C. Газ-носитель (подвижная фаза) — азот, расход 80 мл/мин. В хроматограф вводили 1 мкл пробы без деления потока. Для надежного разделения метиловых эфиров применяли программное изменение температуры колонки в процессе хроматографирования по следующей схеме (общее время анализа — 21,5 мин):

- начальная температура колонки 100°C;
- градиентное увеличение температуры до 120°C со скоростью 8°C/мин в течение 2,5 мин;
- градиентное увеличение температуры до 230°C со скоростью 10°C/мин в течение 11 мин;
- изотермический участок при температуре 230°C в течение 8 мин.

Градуировку (калибровку) проводили с использованием стандартного образца состава смеси 37 метиловых эфиров жирных кислот. Для расчета доверительного интервала времени элюирования МЭЖК хроматографирование стандартной смеси проводили в трех повторностях (N=3). Полученные результаты приведены в табл. 1. На рис. 1 представлена хроматограмма стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот.

Стандартная смесь оптимальна по составу для анализа жирных кислот как животного (в том числе молочного), так и растительного происхождения. В соответствии с действующей нормативной документацией при анализе молока и молочной продукции, маргарина

Таблица 1
Калибровка хроматографической системы при определении ЖКС (n=3)

Условное обозначение жирных кислот	Наименование кислоты		Время элюирования, мин
	По женеvской номенклатуре	По тривиальной номенклатуре	
C _{4:0}	Бутановая	Масляная	2,97 ± 0,02
C _{6:0}	Гексановая	Капроновая	3,49 ± 0,02
C _{8:0}	Октановая	Каприловая	4,57 ± 0,02
C _{10:0}	Декановая	Каприновая	6,26 ± 0,02
C _{11:0}	Ундекановая	Ундекановая	7,25 ± 0,02
C _{12:0}	Додекановая	Лауриновая	8,25 ± 0,02
C _{13:0}	Тридекановая	Тридекановая	9,26 ± 0,02
C _{14:0}	Тетрадекановая	Миристиновая	10,23 ± 0,02
C _{14:1}	Миристолеиновая	Миристолеиновая	10,63 ± 0,02
C _{15:0}	Пентадекановая	Пентадекановая	11,18 ± 0,02
C _{15:1}	Пентадеценная	Пентадеценная	11,58 ± 0,02
C _{16:0}	Гексадекановая	Пальмитиновая	12,09 ± 0,02
C _{16:1}	Гексадеценная	Пальмитолеиновая	12,37 ± 0,02
C _{17:0}	Гептадекановая	Маргариновая	12,95 ± 0,02
C _{17:1}	Гептадеценная	Гептадеценная	13,24 ± 0,02
C _{18:0}	Октадекановая	Стеариновая	13,79 ± 0,02
C _{18:1n9t}	Элаидиновая	Элаидиновая	13,93 ± 0,02
C _{18:1n9c}	Октадеценная	Олеиновая	14,03 ± 0,02
C _{18:2n6t}	Линолеидиновая	Линолеидиновая	14,24 ± 0,02
C _{18:2n6c}	Октадекадиеновая	Линолевая	14,49 ± 0,02
C _{18:3n3}	Гамма-линоленовая	Гамма-линоленовая	14,78 ± 0,02
C _{18:3n3}	Октадекатриеновая	Линоленовая	15,09 ± 0,02
C _{20:0}	Эйкозановая	Арахидиновая	15,60 ± 0,02
C _{20:1}	Эйкозеновая	Гондоиновая	15,91 ± 0,02
C _{20:2}	Эйкозодиеновая	Эйкозодиеновая	16,49 ± 0,03
C _{20:3n6}	Эйкозатриеновая	Эйкозатриеновая	16,64 ± 0,02
C _{20:3n3}	Эйкозатриеновая	Эйкозатриеновая	16,86 ± 0,02
C _{20:4n6}	Арахидиновая	Арахидиновая	17,11 ± 0,02
C _{21:0}	Генэйкозановая	Генэйкозановая	17,27 ± 0,02
C _{22:0}	Докозановая	Бегеновая	17,84 ± 0,03
C _{22:1n9}	Докозеновая	Эруковая	17,97 ± 0,03
C _{22:2}	Докозодиеновая	Докозодиеновая	18,29 ± 0,03
C _{22:3n3}	Докозагексаеновая	Докозагексаеновая	19,12 ± 0,03
C _{23:0}	Трикозановая	Трикозановая	19,26 ± 0,04
C _{24:0}	Тетракозановая	Лигноцеринная	20,97 ± 0,04
C _{24:1}	Тетракозеновая	Нервоновая	21,74 ± 0,05

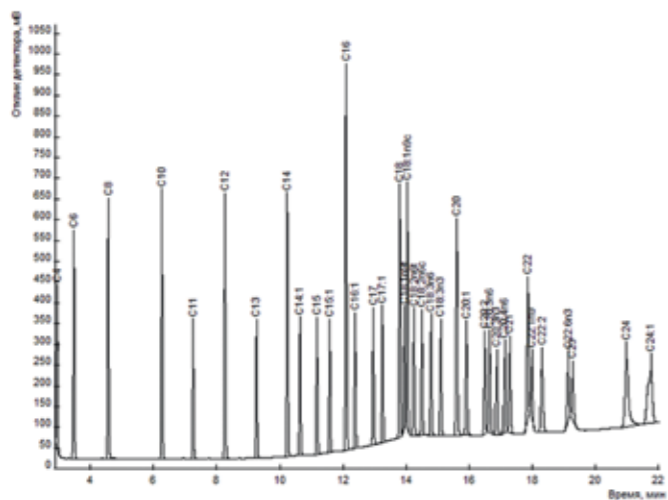


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси 37 метиловых эфиров жирных кислот (условные обозначения приведены в табл. 1)

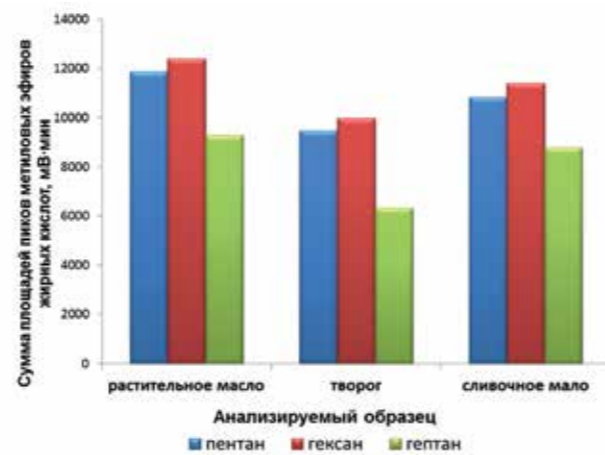


Рис. 2. Зависимость суммы площадей пиков МЭЖК от природы экстрагирующего растворителя

и маргариновой продукции определяют жирнокислотный состав с $C_{4,0}$ по $C_{22,0}$ при анализе растительных масел — с $C_{14,0(16,0)}$ по $C_{22,0}$.

Оптимизация условий пробоподготовки. Этап подготовки пробы является ключевым моментом при определении ЖКС, поскольку ошибки, сделанные на этой стадии, могут привести не только к искажению действительных результатов, но и к поломке используемого в работе дорогостоящего оборудования, обусловленной низкой степенью гидролиза и недостаточной очисткой пробы.

Условия выделения жировой фазы и очистки образца. Для проведения исследования ЖКС образцов молочной и масложировой продукции необходимо отделение жировой фазы от мешающих нежировых компонентов. Эта процедура для молочных и растительных жиров схожа. Поэтому все жиры образца подвергаются изучению и определению без исключения. Если жирность продукта менее 2%, то его ЖКС определять крайне сложно и нецелесообразно.

Проблема экстракции жировой фазы наиболее актуальна для молочных продуктов и масложировой про-

дукции, поскольку растительные масла представляют собой концентрированные триглицериды жирных кислот и могут подвергаться непосредственной реакции переэтерификации при условии разбавления в подходящем растворителе.

Стандартные методики определения ЖКС основаны на выделении жировой фазы продукта в чистом виде, что затруднено при работе с образцами небольшой массы (5–10 г) и образцами низкой жирности. По этой причине проведение реакции переэтерификации удобно совместить со стадией экстракции жировой фазы. Кроме того, при выполнении стандартной процедуры экстракции часто образуется стойкая, неосаждаемая эмульсия. Для решения этой проблемы необходимо добавить небольшое количество этилового спирта, что приведет к свертыванию белка продукта. Этот подход используется и для снижения силы поверхностного натяжения в случае наличия эмульгаторов в образце.

Для выбора подходящего растворителя проводили определение ЖКС образцов творога, сливочного и растительного масла в соответствии со схемой 1.

Схема 1. Выбор оптимального растворителя для подготовки проб растительных и молочных продуктов

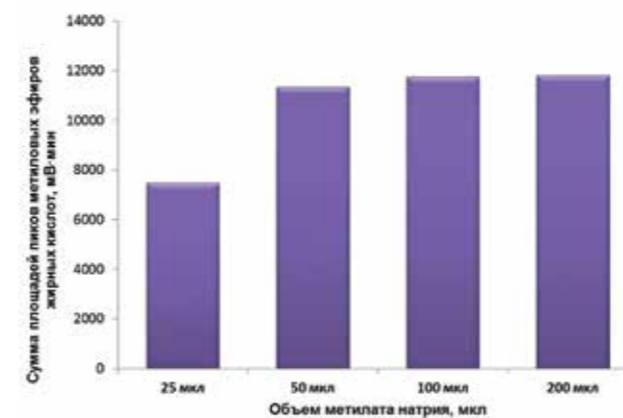


Рис. 3. Зависимость суммы площадей пиков МЭЖК от используемого объема 2 М раствора метилата натрия

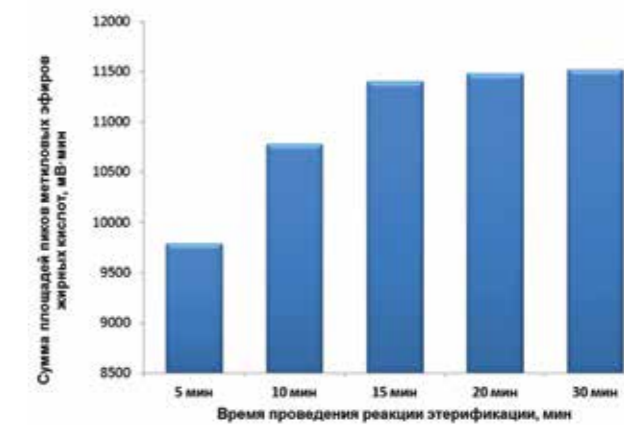


Рис. 4. Зависимость суммы площадей пиков МЭЖК от времени проведения реакции этерификации

Выбор оптимального растворителя проводили по зависимости суммы площадей пиков определяемых компонентов, полученных на хроматограмме экстракта анализируемого продукта, от природы растворителя (пентана, гексана или гептана). Полученные данные представлены на рис. 2.

Из данных, представленных на рис. 2, следует, что площади пиков максимальны при использовании в качестве экстрагирующего растворителя *n*-гексана. Применение гептана приводит к уменьшению площадей пиков, особенно жирных кислот с низким числом атомов углерода (с $C_{4,0}$ по $C_{10,0}$). По полученным результатам сложно отдать приоритет использованию пентана или гексана, однако основным недостатком пентана является его повышенная летучесть.

Условия проведения реакции этерификации. Для оптимизации условий реакции получения МЭЖК из триглицеридов, содержащихся в жировой фазе исследуемых образцов, варьировали объем реагента метилата натрия (2 моль/л), добавленного в реакционную смесь, и время проведения реакции.

Выбор объема метилата натрия. Для выбора оптимального объема метилата натрия проводили серию экспериментов: реакции гидролиза и метилирования ЖК при добавлении 25, 50, 100 и 200 мкл раствора метилата натрия концентрацией 2 моль/л к 950 мкл гексанового экстракта сливочного масла. Полученная зависимость суммы площадей пиков МЭЖК подготовленного экстракта от объема добавленного реагента представлена на рис. 3.

Схема 2. Определение ЖКС молочной продукции и растительного масла методом ГХ-ПИД

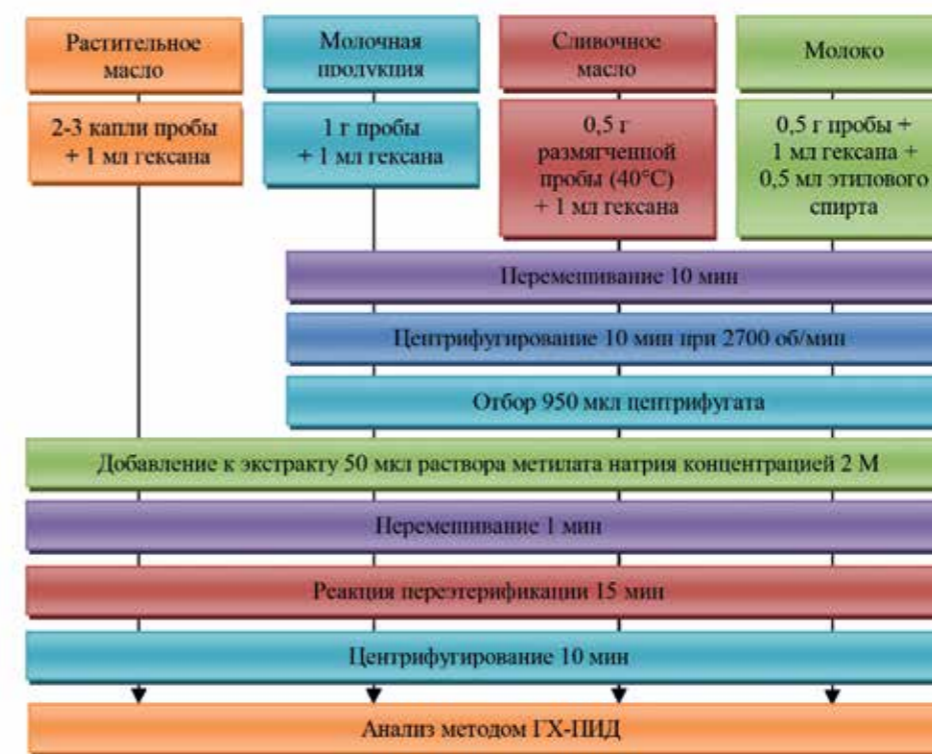


Таблица 2
Контроль качества определения жирнокислотного состава с использованием стандартных образцов Restek (n=2)

Стандартный образец	AOCS #3 (10 components)			AOCS #2 (5 components)			AOCS #4 (4 components)			AOCS #6 (7 components)			AOCS #1 (6 components)		
	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %
C _{14:0}	0,97	1,0	-3,0	6,91	7,0	-1,3	11,19	11,0	1,7	1,91	2,0	-4,5	-	-	-
C _{16:0}	4,05	4,0	1,3	4,81	5,0	-3,8	2,88	3,0	-4,0	29,83	30,0	-0,6	6,01	6,0	0,2
C _{16:1}	-	-	-	18,12	18,0	0,7	79,83	80,0	-0,2	2,91	3,0	-3,0	-	-	-
C _{18:0}	2,88	3,0	-4,0	36,26	36,0	0,7	6,10	6,0	1,7	14,02	14,0	0,1	2,91	3,0	-3,0
C _{18:1}	45,36	45,0	0,8	33,9	34,0	-0,3	-	-	-	41,34	41,0	0,8	35,2	35,0	0,6
C _{18:2}	15,2	15,0	1,3	-	-	-	-	-	-	7,05	7,0	0,7	49,89	50,0	-0,2
C _{18:3}	3,04	3,0	1,3	-	-	-	-	-	-	2,94	3,0	-2,0	3,02	3,0	0,7
C _{20:0}	2,91	3,0	-3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,97	3,0	-1,0
C _{22:0}	2,89	3,0	-3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{22:1}	19,84	20,0	-0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{24:0}	2,86	3,0	-4,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Как видно из приведенной зависимости (рис. 3), 25 мкл раствора метилата натрия недостаточно для гидролиза триглицеридов и этерификации всех выделенных жирных кислот, содержащихся в экстрагированной жировой фазе сливочного масла, что приводит к искажению результатов анализа и невозможности правильной оценки качества анализируемого продукта. С другой стороны, это крайне негативно влияет на рабочие части используемого оборудования: инжектор, капиллярную колонку и шприц для ввода пробы. 50 мкл реагента достаточно для омыления триглицеридов, содержащихся в экстракте, поскольку увеличение его объема до 200 мкл не оказывает значительного влияния на площади пиков. Однако избыточное количество метилата натрия существенно искажает форму пиков, что мешает их правильной разметке и интерпретации полученных данных. Поэтому оптимальный объем раствора метилата натрия концентрацией 2 моль/л составил 50 мкл.

Выбор времени проведения реакции этерификации. Для выбора оптимального времени реакции получения метиловых эфиров выдерживали реакционную смесь, состоящую из 950 мкл гексанового экстракта сливочного масла и 50 мкл раствора метилата натрия (2 моль/л), в течение 5, 10, 15, 20 и 30 мин при комнатной температуре. Полученная зависимость суммы площадей пиков МЭЖК от времени проведения реакции представлена на рис. 4.

Из приведенной зависимости (рис. 4) следует, что увеличение времени проведения реакции с 15 до 30 мин не приводит к существенному увеличению площадей пиков определяемых компонентов, поэтому оптимальным временем реакции получения МЭЖК является 15 мин.

Схема определения жирнокислотного состава молочной и растительной продукции приведена на схеме 2.

Контроль качества определения жирнокислотного состава с использованием стандартных и контрольных образцов. Для контроля качества проводимых исследований ЖКС растительных масел и молочной продукции предварительно оценили состав стандартных образцов растительных и животных жиров Restek. Анализ сертифицированного референтного материала необходим для оценки правильности разметки пиков, расчета массовых долей МЭЖК и интерпретации полученных данных, а также контроля стабильности работы используемого оборудования. Результаты контроля приведены в табл. 2.

Согласно данным табл. 2, относительная погрешность определения массовой доли МЭЖК стандартных образцов не превышает 5%, что позволяет проводить оценку подлинности различных видов растительных и животных жиров методом ГХ-ПИД при выбранных оптимальных условиях.

В качестве контрольных использовали образцы натурального происхождения (сырое коровье молоко) и образцы масложировой и молочной продукции с заявленным содержанием растительных жиров (продукт плавленный с сыром и продукт творожный). Результаты контроля методики с использованием положительных и отрицательных образцов приведены в табл. 3.

Результаты определения ЖКС контрольных образцов соответствуют заявленной о них информации: по значениям соотношений массовых долей МЭЖК отрицательные контрольные образцы являются натуральными молочными продуктами, положительные

Таблица 3
Контроль качества определения жирнокислотного состава с использованием контрольных образцов (n=2)

Обозначение жирной кислоты	Массовая доля метиловых эфиров жирных кислот, %					
	Отрицательный контроль		Положительный контроль			Нормативное значение [8, 12]
	Молоко коровье (образец №1)	Молоко коровье (образец №2)	Продукт творожный (м.д.ж. 18,0%)	Продукт плавный с сыром (образец №1)	Продукт плавный с сыром (образец №2)	
C _{4:0} масляная	3,0	2,7	0,1	0,05	0,05	2,0-4,2
C _{6:0} капроновая	2,2	2,0	0,1	0,07	0,04	1,5-3,0
C _{8:0} каприловая	1,4	1,4	0,3	0,2	0,04	1,0-2,0
C _{10:0} каприновая	3,4	3,4	0,9	0,1	0,06	2,0-3,5
C _{12:0} лауриновая	3,9	4,1	1,4	0,5	0,2	2,0-4,0
C _{14:0} миристиновая	12,5	12,9	5,8	1,2	1,1	8,0-13,0
C _{14:1} миристолеиновая	1,7	2,0	0,4	0,5	0,2	0,6-1,5
C _{16:0} пальмитиновая	31,8	34,1	39,9	40,9	40,8	22,0-33,0
C _{16:1} пальмитолеиновая	1,2	1,3	0,8	0,09	0,09	1,5-2,0
C _{18:0} стеариновая	11,5	9,7	10,1	4,6	4,7	9,0-13,0
C _{18:1} олеиновая	23,9	23,3	35,0	44,3	44,2	22,0-32,0
C _{18:2} линолевая	2,5	2,5	4,7	7,0	8,0	3,0-5,5
C _{18:3} линоленовая	0,7	0,5	0,1	0,1	0,2	до 1,5
C _{20:0} арахидиновая	0,2	0,1	0,3	0,3	0,33	до 0,3
C _{22:0} бегеновая	0,05	0,03	0,1	0,05	0,09	до 0,1
Соотношение метиловых эфиров жирных кислот молочного жира						
Пальмитиновой (C _{16:0}) к лауриновой (C _{12:0})	8,2	8,3	28,5	81,8	204	5,8-14,5
Стеариновой (C _{18:0}) к лауриновой (C _{12:0})	2,9	2,4	7,2	9,2	23,5	1,9-5,9
Олеиновой (C _{18:1}) к миристиновой (C _{14:0})	1,9	1,8	6,0	36,9	40,2	1,6-3,6
Линолевой (C _{18:2}) к миристиновой (C _{14:0})	0,2	0,2	0,8	5,8	7,3	0,2-0,5
Суммы олеиновой и линолевой к сумме лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой	0,4	0,4	0,7	1,1	1,1	0,4-0,7

контрольные образцы содержат жиры растительного происхождения. Приемлемые результаты контрольной процедуры дают возможность использования методики для определения фальсификации продукции.

Определение жирнокислотного состава молочных продуктов. Жировая фаза молочных продуктов должна содержать только молочный жир коровьего молока. Жирнокислотный состав молочного жира приведен в нормативной документации [2-4, 8]. В табл. 4 представлены результаты определения ЖКС некоторых молочных продуктов (сыра, шоколадного сливочного масла, сливочного масла, сметаны и творога). Фальсификацию жировой фазы молочных продуктов из коровьего молока жирами немолочного происхождения устанавливают по результатам

сравнения полученных соотношений массовых долей МЭЖК (или их сумм) с показателями, указанными в нормативных документах [8]. Если значение хотя бы одного из соотношений массовых долей МЭЖК (или их сумм) выходит за установленные границы соотношений, то это свидетельствует о фальсификации жировой фазы продуктов из коровьего молока жирами немолочного происхождения.

Всего по итогам работы было проанализировано 79 образцов молока и молочных продуктов: 10 проб сливочного масла (в том числе 1 проба шоколадного и 1 проба топленого масла), 15 проб кефира и биоюгурта; 10 проб питьевого пастеризованного молока (м.д.ж. 3,2%); 10 проб сырого коровьего молока; 4 пробы сыра; 15 проб сметаны (м.д.ж. 15, 20 и 30%); 8 проб творога (м.д.ж. 1,8; 5,0 и 18,0%); 2 пробы плавленного сыра; 4 про-

Таблица 4
Жирнокислотный состав жировой фазы молочных продуктов (n=2)

Наименование жирной кислоты	Массовая доля метиловых эфиров жирных кислот, %					
	Сыр (образец №1) (м.д.ж. 50 %)	Сыр (образец №2) (м.д.ж. 25 %)	Сыр (образец №2) (м.д.ж. 50 %)	Масло шоколадное сливочное (м.д.ж. 62 %)	Масло крестьянское (м.д.ж. 72,5 %)	Нормативное значение [8, 12]
C _{4:0} масляная	1,8	1,9	1,3	2,3	3,0	2,0-4,2
C _{6:0} капроновая	1,3	1,6	1,0	1,6	2,2	1,5-3,0
C _{8:0} каприловая	0,9	1,2	0,7	1,1	1,5	1,0-2,0
C _{10:0} каприновая	2,0	3,0	1,6	2,5	3,5	2,0-3,5
C _{12:0} лауриновая	2,5	3,8	2,2	3,8	4,3	2,0-4,0
C _{14:0} миристиновая	9,1	12,5	7,4	10,3	13,7	8,0-13,0
C _{16:0} пальмитиновая	33,7	33,9	36,3	35,5	36,8	22,0-33,0
C _{18:0} стеариновая	11,1	10,4	7,8	8,0	8,5	9,0-13,0
C _{18:1} олеиновая	31,5	29,2	34,9	29,5	23,6	22,0-32,0
C _{18:2} линолевая	5,5	2,0	6,5	4,6	2,0	3,0-5,5
C _{18:3} линоленовая	0,7	0,4	0,3	0,6	0,7	до 1,5
C _{20:0} арахиновая	0,07	0,08	0,21	0,27	0,25	до 0,3
C _{22:0} бегеновая	0,05	0,04	0,02	0,03	0,05	до 0,1
Соотношение метиловых эфиров жирных кислот молочного жира						
Пальмитиновой (C _{16:0}) к лауриновой (C _{12:0})	13,5	8,9	16,8	9,3	8,6	5,8-14,5
Стеариновой (C _{18:0}) к лауриновой (C _{12:0})	4,4	2,7	3,6	2,1	2,0	1,9-5,9
Олеиновой (C _{18:1}) к миристиновой (C _{14:0})	3,5	2,3	4,8	2,9	1,7	1,6-3,6
Линолевой (C _{18:2}) к миристиновой (C _{14:0})	0,6	0,2	0,9	0,5	0,2	0,2-0,5
Суммы олеиновой и линолевой к сумме лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой	0,7	0,5	0,8	0,6	0,4	0,4-0,7

бы продукта плавленного с сыром и 1 проба творожного продукта. Из них 15 проб не соответствовали нормативным значениям по соотношениям массовых долей МЭЖК, а значит были фальсифицированы жирами немолочного происхождения. Следует заметить, что 1 проба творожного продукта и 4 пробы плавленного продукта с сыром изготовлены с использованием заменителей молочного жира и не могут считаться фальсифицированными. Они были исследованы в качестве контрольных образцов, заведомо не соответствующих по ЖКС молочному жиру.

На рис. 5 в качестве примера представлена хроматограмма ЖКС жировой фазы образца сыра (м.д.ж. 50%).

Определение жирнокислотного состава растительных масел. При выбранных ранее оптимальных условиях гидролиза триглицеридов жировой фазы и получения МЭЖК проводили определение ЖКС различных видов растительного масла: оливкового, под-

солнечного, тыквенного и кукурузного. Результаты представлены в табл. 5.

Результаты определения ЖКС 4 образцов растительного масла из 5 исследованных расходятся с нормативными значениями [2] (с учетом погрешности измерения жирнокислотного состава в соответствии с ГОСТ 30418-96: 7–15%), что говорит о фальсификации представленных образцов.

Совпадение результатов измерения в пределах допускаемой погрешности исследуемой продукции с ЖКС оливкового масла не говорит о его подлинности, так как окончательная идентичность продукции должна быть подтверждена дополнительными испытаниями, при которых кроме жирнокислотного состава должна быть установлена идентичность триглицеридного состава газохроматографическим анализом [2].

Хроматограмма исследованного образца подсолнечного масла высшего сорта приведена на рис. 6.

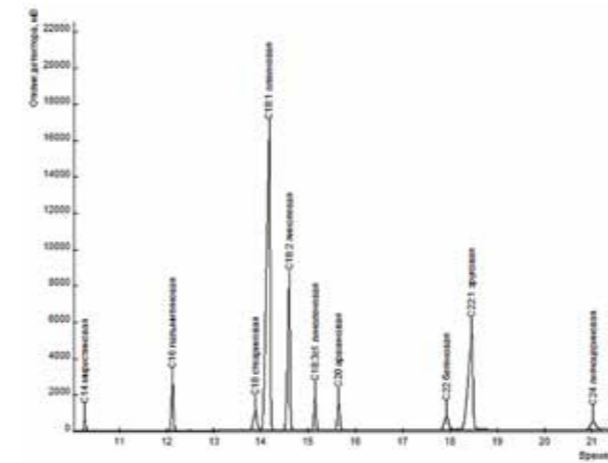


Рис. 5. Хроматограмма ЖКС жировой фазы сыра (м.д.ж. 50%)

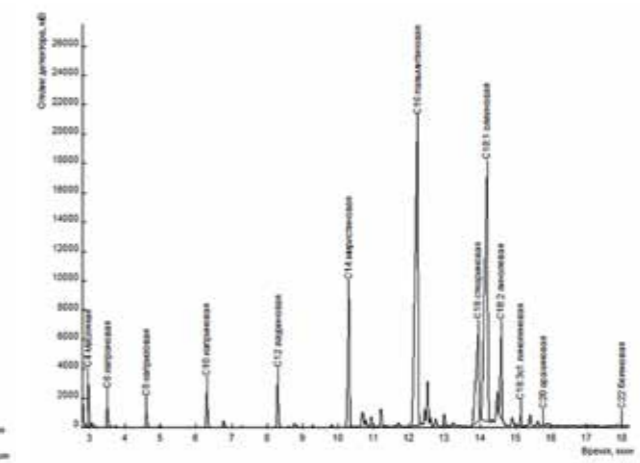


Рис. 6. Хроматограмма ЖКС жировой фазы подсолнечного масла высшего сорта

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований усовершенствована методика определения жирнокислотного состава молочной и растительной продукции (растительного масла) методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием, отличительной особенностью которой является совмещение стадий экстракции жировой фазы и получения производных (метиловых эфиров). Оптимизированы условия подготовки проб молока, молочных продук-

тов и растительного масла: выбран растворитель для экстракции жировой фазы продукта (гексан); объем метилата натрия (2 М), необходимый для проведения реакции этерификации (50 мкл); время проведения реакции для полного омыления триглицеридов (15 мин).

С использованием представленной методики проанализированы опытные образцы молочной продукции (79 проб) и растительного масла (5 проб), из них:

- 15 проб молочной продукции (сливочное масло, сыр, сметана, сыр плавильный, творог, молоко питьевое)

Таблица 5
Жирнокислотный состав жировой фазы растительных масел (n=2)

Обозначение жирной кислоты	Массовая доля метиловых эфиров жирных кислот, %								
	Оливковое масло	Нормативное значение [2]	Подсолнечное масло высшего сорта	Подсолнечное масло высокой очистки	Нормативное значение [2]	Тыквенное масло	Нормативное значение [2]	Кукурузное масло	Нормативное значение [2]
C _{12:0}	0,01	-	-	-	-	-	-	0,3	до 0,3
C _{14:0}	0,01	-	0,9	1,0	до 0,2	-	-	1,5	до 0,3
C _{16:0}	11,9	7,0-20,0	9,9	9,8	5,6-7,6	17,5	5,9-12,0	14,8	9,0-14,0
C _{16:1}	1,0	0,3-3,5	0,3	0,2	до 0,3	-	-	0,2	до 0,5
C _{18:0}	2,7	1,5-4,3	4,7	5,3	2,7-6,5	6,8	3,0-6,0	5,1	0,5-4,0
C _{18:1}	77,6	56,0-83,0	30,8	28,4	14,0-39,4	33,4	24,0-47,0	31,6	24,0-42,0
C _{18:2}	5,4	3,3-20,0	52,0	54,0	18,3-74,0	41,4	26,0-57,0	44,1	34,0-62,0
C _{18:3}	0,7	0,4-1,5	0,2	0,1	до 0,2	0,4	до 9,0	1,4	до 2,0
C _{20:0}	0,4	0,2-1,6	0,3	0,3	0,2-0,4	0,4	до 0,5	0,3	до 1,0
C _{20:1}	0,3	0,2-0,5	0,1	0,1	до 0,2	-	-	0,2	до 0,5
C _{22:0}	0,1	-	0,6	0,7	0,5-1,3	-	-	0,3	до 0,5
C _{22:1}	-	-	0,01	-	до 0,2	-	-	-	-
C _{22:2}	-	-	0,04	0,01	до 0,3	-	-	-	-
C _{24:0}	-	-	0,2	0,2	0,2-0,3	-	-	0,2	до 0,5

не соответствовали требованиям ГОСТ Р 52253-2004, что обусловлено наличием в составе жиров немолочного происхождения;

- 4 пробы растительного масла не соответствовали требованиям ГОСТ 30623-98.

Полученные результаты подтверждают возможность применения усовершенствованной методики в химических лабораториях для рутинного анализа проб молока, молочной и растительной продукции при определении жирнокислотного состава с целью обнаружения фальсификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ 28928-91. Заменители масла какао. Метод определения состава триглицеридов. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 2005. — 3 с.
- ГОСТ 30623-98. Масла растительные и маргариновая продукция. Метод обнаружения фальсификации. — М.: Стандартинформ, 2010. — 16 с.
- ГОСТ 31452-2012. Сметана. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2013. — 9 с.
- ГОСТ 31453-2013. Творог. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2013. — 10 с.
- ГОСТ 31663-2012. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот. — М.: Стандартинформ, 2013. — 8 с.
- ГОСТ 31754-2012. Масла растительные, жиры животные и продукты их переработки. Методы определения массовой доли трансизомеров жирных кислот. — М.: Стандартинформ, 2014. — 24 с.
- ГОСТ 31979-2012. Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стерингов. — М.: Стандартинформ, 2014. — 10 с.
- ГОСТ Р 52253-2004. Масло и паста масляная из коровьего молока. Общие технические условия. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 2004. — 21 с.
- ГОСТ Р ИСО 23275-1-2013. Жиры и масла животные и растительные. Эквиваленты масла какао в масле какао и шоколаде. Часть 1. Определение наличия эквивалентов масла какао. — М.: Стандартинформ, 2014. — 19 с.
- ГОСТ Р ИСО 23275-2-2013. Жиры и масла животные и растительные. Эквиваленты масла какао в масле какао и шоколаде. Часть 2. Определение количества эквивалентов масла какао. — М.: Стандартинформ, 2014. — 15 с.
- Журавлев А.В. Трансжиры: что это такое и с чем их едят (краткий вариант). — М., 2012. — 58 с.
- МУ 4.1./4.2.2484-09. Методические указания по оценке подлинности и выявлению фальсификации молочной продукции. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 26 с.
- Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 024/2011. Технический регламент на масложировую продукцию: утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 г. № 883. — 37 с.
- Adlof R.O., Copes L.C., Emken E.A. Analysis of the Monoenoic Fatty Acid Distribution in Hydrogenated

Vegetable Oils by Silver-Ion High-Performance Liquid Chromatography // JAOCS. — 1995. — Vol. 72, № 5. — P. 571–574.

15. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / M. Holcapek, P. Jandera, P. Zderadicka, L. Hruby // J. Chromatogr. A. — 2003. — Vol. 1010. — P. 195–215.

16. Chemical profiling of triacylglycerols and diacylglycerols in cow milk fat by ultra-performance convergence chromatography combined with a quadrupole time-of-flight mass spectrometry / Q. Zhou, B. Gao, X. Zhang [et al.] // Food Chemistry. — 2014. — Vol. 143. — P. 199–204.

17. Determination of fatty acid profile in cow's milk using mid-infrared spectrometry: Interest of applying a variable selection by genetic algorithms before a PLS regression / M. Ferrand, B. Huquet, S. Barbey [et al.] // Chemom. Intell. Lab. Syst. — 2011. — Vol. 106, № 2. — P. 183–189.

18. Determination of free fatty acids in edible oils by ¹H NMR spectroscopy / C. Skiera, P. Steliopoulos, T. Kuballa [et al.] // J. Lipid Technology. — 2012. — Vol. 24, № 12. — P. 279–281.

19. Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography / L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada, M. Juarez // JAOCS. — 1997. — Vol. 74, № 2. — P. 131–135.

20. Determination of underivatized long chain fatty acids using RP-HPLC with capacitively coupled contactless conductivity detection / A. Makahleh, B. Saad, G. Siang [et al.] // J. Talanta. — 2010. — Vol. 81. — P. 20–24.

21. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry / H. Soyeurt, P. Dardenne, F. Dehareng [et al.] // J. Dairy Sci. — 2006. — Vol. 89, № 9. — P. 3690–3695.

22. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids / L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada [et al.] // J. Dairy Sci. — 1999. — Vol. 82. — P. 878–884.

23. Juaneda P. Utilisation of reversed-phase high-performance liquid chromatography as an alternative to silver-ion chromatography for the separation of cis- and trans-C18:1 fatty acid isomers // J. Chromatogr. A. — 2002. — Vol. 954. — P. 285–289.

24. Occurrence of trans-C18:1 fatty acid isomers in goat milk: effect of two dietary regimens / M. LeDoux, A. Rouzeau, P. Bas, D. Sauvant // J. Dairy Sci. — 2002. — Vol. 85. — P. 190–197.

25. Precht D., Molken J. Identification and quantitation of cis/trans C16:1 and C17:1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry // European J. Lipid Sci. Technol. — 2000. — Vol. 102. — P. 102–113.

26. Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography / D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis // J. Dairy Sci. — 1998. — Vol. 81. — P. 2833–2840.

УДК 619.579.842.14-02

ПРОТЕОМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИИ РОДА *SALMONELLA*

Н.Б. Шадрова¹, О.В. Прунтова², Г.С. Скитович³

¹ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shadrova@arriah.ru

² руководитель Испытательного центра, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: skitovich@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты изучения протеомических свойств изолятов бактерии рода *Salmonella* методом MALDI-TOF на масс-спектрометре MALDI Autoflex III. Идентификация микроорганизмов проводилась методом прямого нанесения с последующей процедурой сравнения полученных масс-спектров с установленной в приборе базой данных. Были определены пики, характерные для многих представителей семейства *Enterobacteriaceae*, и отношение масса/заряд (m/z), характеризующее представителей рода *Salmonella*.

Ключевые слова: масс-спектрометр, MALDI-TOF, бактерии рода сальмонелла.

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные бактерии рода сальмонелла являются одними из основных возбудителей кишечных инфекционных болезней и представляют значительную проблему для здравоохранения в развитых и развивающихся странах, вызывая пищевые токсикоинфекции. Ежегодно в мире регистрируется 1,3 млрд случаев гастроэнтерита и 3 млн летальных случаев из-за заражения сальмонеллами.

Переносчиками сальмонелл являются преимущественно сельскохозяйственные животные, кроме того, передача сальмонелл может осуществляться от животного к человеку и от человека к человеку. Основным источником заражения человека сальмонеллами являются продукты как животного, так и растительного происхождения (мясо, яйца, молочные продукты, фрукты и овощи). Современное направление в производстве пищевых продуктов, называемое «органическое» растениеводство, также повышает риск пищевых отравлений, в том числе и сальмонеллеза [1].

В последнее десятилетие, наряду с классическими и молекулярно-биологическими методами идентификации микроорганизмов, все чаще применяется метод идентификации микроорганизмов по их белковым профилям, или прямое белковое профилирование. Данный метод не уступает по таким показателям, как точность и специфичность идентификации, однако его выгодно отличают быстрота проведения и более низкая себестоимость анализов [2, 3, 9, 10].

Метод времяпролетной MALDI масс-спектрометрии (MALDI-TOF) основан на десорбции и ионизации исследуемого вещества с помощью лазерного излучения

в присутствии матрицы с последующим разделением ионов во времяпролетном масс-анализаторе. Под воздействием лазерных импульсов матрица, сокристаллизованная с исследуемым веществом, активно поглощает излучение лазера, что приводит к ее десорбции. Переходя в газовую фазу, матрица увлекает за собой молекулы исследуемого вещества, а также способствует их ионизации с образованием преимущественно однозарядных ионов [7]. Метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки (прямое белковое профилирование), т. е. без фракционирования и очистки отдельных белков, и получать уникальные для данного вида масс-спектры с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» [4].

Для идентификации микроорганизмов обычно используют спектры в диапазоне масс 2–20 кДа. Анализ масс-спектров *E. coli* в данном диапазоне показал, что из 2000 белков, рассчитанных на основании данных секвенированного генома *E. coli*, в спектрах присутствует только 30 [11]. Большинство полученных пиков были отнесены к рибосомальным белкам, остальные — к ДНК-связывающим белкам и белкам холодового шока. Рибосомальные белки являются достаточно консервативными, что обеспечивает их таксономическую специфичность. Помимо этого, рибосомальные белки в большом количестве присутствуют в цитоплазме клеток — до половины массы растущей клетки, а их набор остается неизменным вне зависимости от внешних условий и стадии роста, что и обеспечивает воспроизводимость масс-спектров. Исследования внутри- и меж-

Таблица 1
Идентификация изолятов бактерий рода *Salmonella* методом белкового профилирования

№	Наименование изолята	Результат MALDI	Критерий идентификации, Ig*	Пик с интенсивностью 100 %, Da
1	<i>Salmonella</i> Typhimurium (говядина № 4975)	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,344	6092
2	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Башкирия»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,579	4363
3	<i>Salmonella</i> Typhimurium «пельмени № 1904»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,511	6092
4	<i>Salmonella</i> Brezany	<i>Salmonella</i> st anatum	2,559	6092
5	<i>Salmonella</i> California	<i>Salmonella</i> st anatum	2,574	6092
6	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Py 3»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,488	6092
7	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Лен»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,574	4364
8	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Глеб»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,423	6092
9	<i>Salmonella</i> Newland утка	<i>Salmonella</i> st anatum	2,591	6093
10	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Ил»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,445	4364
11	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Юб»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,442	6092
12	<i>Salmonella</i> Typhimurium «к/к 16»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,509	6092
13	<i>Salmonella</i> Typhimurium «к/к 7»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,509	6096
14	<i>Salmonella</i> Virchow свинина 31	<i>Salmonella</i> st anatum	2,506	6093
15	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Мордовия»	<i>Salmonella</i> sp. enterica st Hadar	2,348	4364
16	<i>Salmonella</i> Enteritidis мясо пельменное (курица) «Py 1»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,473	6091
17	<i>Salmonella</i> Enteritidis мясо пельменное «Pel»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,482	6092
18	<i>Salmonella</i> Moscow «Радон» комбикорм	<i>Salmonella</i> sp. enteritidis	2,477	6091
19	<i>Salmonella</i> Dublin «Рассвет»	<i>Salmonella</i> sp. enterica st dublin	2,536	6093
20	<i>Salmonella</i> Saintpaul	<i>Salmonella</i> st anatum	2,649	6092
21	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Краснодар»	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,247	4363
22	<i>Salmonella</i> S.W	<i>Salmonella</i> sp. enteritidis	2,408	6090
23	<i>Salmonella</i> Choleraesuis № 2 «Тамбов»	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,457	6092
24	<i>Salmonella</i> Choleraesuis свинина «Татарстан»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,528	6092
25	<i>Salmonella</i> Dublin «Кольчугино»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,654	6092
26	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Ульяновск»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,419	6092
27	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Владимир»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,523	4364

* 2,300–3,000 — высокая вероятность идентификации вида;
2,000–2,299 — гарантированная идентификация рода, возможная идентификация вида;
1,700–1,999 — возможная идентификация рода.

лабораторной воспроизводимости показали высокую надежность метода MALDI-TOF [2].

Целью данной работы было изучение протеомических свойств изолятов бактерий рода сальмонелла, выделенных из пищевых продуктов и кормов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изоляты. 27 изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из пищевых продуктов и кормов на территории РФ в лаборатории микробиологии ФГБУ «ВНИИЗЖ» за 2006–2010 гг.

Матрица. Насыщенный раствор СНСА (α-циано-4-гидроксикоричная кислота) и органический растворитель (basic organic solvent) — раствор 50%-ный ацетонитрил/2,5% трифторуксусная кислота.

База данных для идентификации бактерий Bruker содержит спектры 4111 микроорганизмов, в том числе спектры 15 штаммов *Salmonella*.

Культивирование. Все используемые изоляты выращивали на колумбийском агаре (*Columbia agar base*) в течение 24 ч при 37°C.

Пробоподготовка. Применяли метод прямого нанесения, при котором единичные колонии свежей культуры наносили на лунки металлического планшета типа «Ground steel» Bruker, используя стерильную петлю. Покрывали сверху раствором матрицы. Высушивали в течение 15 минут. Помещали планшет в прибор.

Калибровку масс-спектрометра проводили перед каждым экспериментом согласно руководству [6], используя в качестве калибранта *Bruker Bacterial Standard* («Bruker» Daltonik, Германия).

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре MALDI Autoflex III Biotyper («Bruker» Daltonik, Германия), используя линейный режим. Параметры анализа оптимизировали для диапазона масс от 2000 до 20137 m/z (масса/время), записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров. При идентификации сальмонелл использовали метод определения микроорганизмов в программном обеспечении: «MBT_MC». Для записи, обработки и анализа полученных масс-спектров использовали программное обеспечение flexControl, MALDI Biotyper версия 3.0 и MALDI Biotyper RTC («Bruker» Daltonik, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения протеомических свойств были отобраны бактерии из музея штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ», которые по биохимическим свойствам были идентифицированы как бактерии рода *Salmonella* и серотипированы по схеме Кауфмана–Уайта (табл. 1).

В связи с тем, что установленная в приборе база данных микроорганизмов включает только 13 серотипов сальмонелл, а существующее в настоящее время число серотипов сальмонелл по схеме Кауфмана и Уайта насчитывает более 2600, результаты идентификации MALDI в части определения серотипа могут не совпадать с результатами классического серотипирования.

В ходе работы по идентификации бактерий с использованием метода белкового профилирования [5, 7] было подтверждено, что все исследуемые микроорганизмы относятся к бактериям рода сальмонелла (табл. 1). При этом критерий идентификации микроорганизмов находился в диапазоне 2,236–2,649, что указывает на высокую вероятность идентификации.

В процессе идентификации бактерий методом MALDI-TOF для всех сальмонелл были построены белковые профили (рисунок), по которым стало возможным определение характерных пиков с высокой интенсивностью.

Было установлено, что 6 из 27 изученных изолятов сальмонелл имели в белковом спектре характерный пик с интенсивностью 100% и показателем m/z 4364 Da. Для всех остальных изолятов таким идентификационным пиком являлся 6092 Da.

По данным Zhou N. и Wang N. [12], уникальным пиком, характеризующим *Salmonella paratyphi*, является пик с величиной m/z 6092 Da. В нашем исследовании такой пик обнаруживался у всех изолятов сальмонелл наряду с пиком 4363 Da.

Был проведен анализ масс-спектров представителей сем. *Enterobacteriaceae*, представленных в базе данных Maldi Biotyper (табл. 2), и обнаружено, что пик 4363±1 Da характерен для многих представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в то время как пик m/z 6092±1 Da встречается только у бактерий рода *Salmonella* и *Trabulsiella guamensis*. Бактерии *Trabulsiella* были открыты в 1985 г. и изначально были отнесены к роду *Salmonella* из-за схожести биохимических признаков [8].

Таким образом, пик m/z 6092 Da можно считать уникальным для бактерий рода *Salmonella*, и данная информация может быть использована при разработке экспресс-методов определения микроорганизмов непосредственно из суспензии материала, без предварительного выделения чистой культуры.

Кроме пиков, используемых для характеристики семейства и рода микроорганизма, по данным Dieckmann R. и Malorny B. [5], установлены характерные серотип-определяющие пики для 5 важнейших в эпидемиологическом значении серотипов сальмонелл: Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis, Hadar. Кроме того, были определены потенциальные серовар-определяющие ионы, которые возможно использовать как биомаркеры для серотипов Choleraesuis, Heidelberg, Gallinarum (табл. 3). Полученные нами результаты подтверждают выводы Dieckmann R. и Malorny B. [5] в отношении серотипов Choleraesuis (*Salmonella* Choleraesuis «Башкирия», *Salmonella* Choleraesuis «Ил», *Salmonella* Choleraesuis «Лен», *Salmonella* Choleraesuis «Мордовия», *Salmonella* Choleraesuis «Владимир») и Enteritidis

(*Salmonella* Enteritidis «Py 3», *Salmonella* Enteritidis «Глеб», *Salmonella* Enteritidis «Pel») (табл. 3).

Отмечено, что изолят *Salmonella* Dublin «Рассвет» имел пик со значением m/z 6008 Da, характерный для серотипа Virchow, а из четырех изученных изолятов, определенных в реакции агглютинации как Typhimurium, характерный пик со значением m/z 7097 Da имел только один изолят — *Salmonella* Typhimurium «к/к № 16».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что для всех изученных изолятов сальмонелл характерными пиками являются m/z 4364 Da (характерный для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*) и 6092 Da (уникальный для бактерий рода *Salmonella*). Результаты, полученные при изучении протеомических характеристик различных серотипов сальмонелл, подтверждают выводы R. Dieckmann и B. Malorny в отношении показательных пиков для серотипов Choleraesuis и Enteritidis, но не в отношении изолятов *Salmonella* Typhimurium.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бхуниа А.К. Патогенные микроорганизмы пищевых продуктов. — Санкт-Петербург: «Профессия», 2014. — 344 с.
- Применение время пролетной Maldi масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов / Е.А. Демидов, К.В. Старостин, В.М. Попик, С.Е. Пельтек // Вавиловский журнал селекции и генетики. — 2013. — Т. 17, № 4/1. — С. 758–764.
- Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry // Analytical Chemistry. — 1975. — Vol. 47. — P. 219–225.

Рис. Белковые профили изолятов бактерии рода *Salmonella*

По шкале абсцисс отложены значения m/z, по шкале ординат — относительная интенсивность пиков, регистрируемая при масс-спектрометрическом анализе.

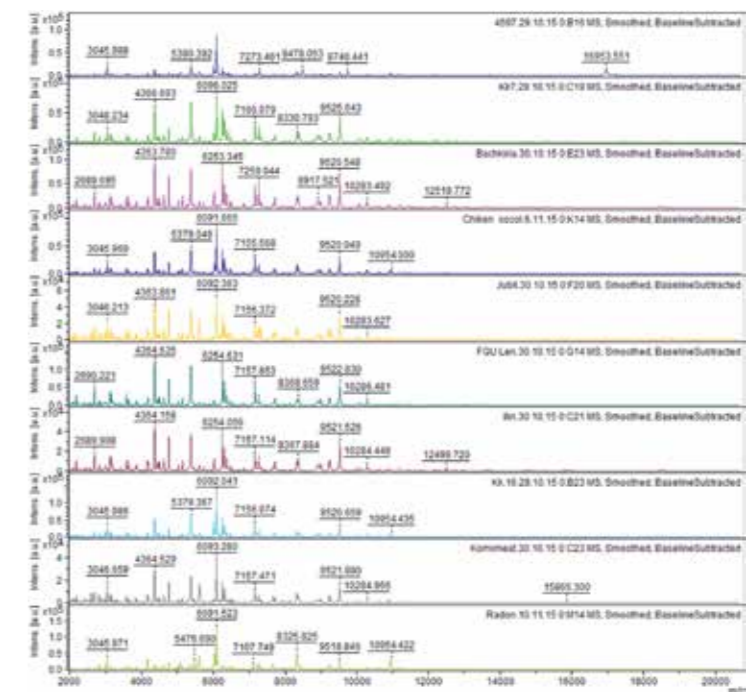


Таблица 2
Наличие характерных пиков у разных представителей сем. *Enterobacteriaceae*

Представители семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	Пики <i>Enterobacteriaceae</i>		Представители семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	Пики <i>Enterobacteriaceae</i>	
	4363±1 Da	6092±1 Da		4363±1 Da	6092±1 Da
<i>Arsenophonus</i>	-	-	<i>Morganella</i>	н/б	-
<i>Biostraticola</i>	н/б*	-	<i>Obesumbacterium</i>	н/б	-
<i>Brenneria</i>	-	-	<i>Pantoea</i>	-	-
<i>Buchnera</i>	н/б	-	<i>Pectobacterium</i>	-	-
<i>Budvicia</i>	-	-	<i>Phaseolibacter</i>	н/б	-
<i>Buttiauxella</i>	-	-	<i>Photorhabdus</i>	-	-
<i>Cedecea</i>	-	-	<i>Plesiomonas</i>	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	<i>Pragia</i>	-	-
<i>Cosenzaea</i>	н/б	-	<i>Proteus</i>	-	-
<i>Cronobacter</i>	-	-	<i>Providencia</i>	-	-
<i>Dickeya</i>	4363	-	<i>Rahnella</i>	-	-
<i>Edwardsiella</i>	-	-	<i>Raoultella</i>	4364	-
<i>Enterobacter</i>	4364	-	<i>Saccharobacter</i>	н/б	-
<i>Erwinia</i>	4362	-	<i>Salmonella</i>	4363	6092
<i>Escherichia</i>	4364	-	<i>Samsonia</i>	-	-
<i>Ewingella</i>	4364	-	<i>Serratia</i>	-	-
<i>Gibbsiella</i>	н/б	-	<i>Shigella</i>	н/б	-
<i>Hafnia</i>	-	-	<i>Shimwellia</i>	4364	-
<i>Klebsiella</i>	4363	-	<i>Sodalis</i>	-	-
<i>Kluuyvera</i>	-	-	<i>Tatumella</i>	-	-
<i>Leclercia</i>	-	-	<i>Thorsellia</i>	н/б	-
<i>Leminorella</i>	-	-	<i>Trabulsiella</i>	4363	6093
<i>Lonsdalea</i>	н/б	-	<i>Wigglesworthia</i>	н/б	-
<i>Mangrovibacter</i>	н/б	-	<i>Xenorhabdus</i>	4364	-
<i>Moellerella</i>	-	-	<i>Yersinia</i>	-	-
			<i>Yokenella</i>	4364	-

н/б — нет базы данных.

4. Ben L.M., van Baar Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry // FEMS Microbiol. Rev. — 2000. — Vol. 24, № 2. — P. 193–219.
5. Dieckmann R., Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars using Whole-Cell MALDI-TOF mass spectrometry // Appl. Environ. Microbiol. — 2011. — Vol. 77, № 12. — P. 4136–4146.

6. MALDI Biotyper User Manual 2008, Version 2.0. SR1; Bruker Daltonic Inc.: Bremen, Germany, 2008. — 130 p.
7. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of non-volatile compounds / M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillencamp // Int. J. Mass Spectrom. Ion Process. — 1987. — Vol. 78. — P. 53–68.
8. McWhorter A., Haddock R, Nocon F. *Trabulsiella guamensis*, a new genus new species of the family *Enterobacteriaceae* that resembles *Salmonella* subgroups 4 and 5 / J. Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29. — P. 1480–1485.
9. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry / K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 1988. — Vol. 2, № 8. — P. 151–153.
10. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / S.B. Barbudde, T. Maier, G. Schwarz [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — Vol. 74, № 17. — P. 5402–5407.
11. Ryzhov V., Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells // Analyt. Chem. — 2001. — Vol. 73, № 4. — P. 746–750.
12. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media / N. Zhou, N. Wang, B. Xu [et al.] // Science China Life Sciences. — 2011. — Vol. 54, № 1. — P. 48–53.

Таблица 3
Протеомическая характеристика отдельных серотипов сальмонелл

Масса (m/z)	Характеристика серотипов (по данным R. Dieckmann и B. Malorny)	Идентификация излятов <i>Salmonella</i> посредством MALDI Autoflex III Biotyper
6,008	<i>Virchow</i>	<i>Salmonella</i> Virchow свинина № 31 <i>Salmonella</i> Dublin «Рассвет»
6,022	<i>Choleraesuis</i>	<i>Salmonella</i> Choleraesuis свинина «Башкирия» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Ил» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Лен» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Мордовия» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Владимир»
6,036	<i>Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Пу 3» цыпленок <i>Salmonella</i> Enteritidis «Глеб» цыплята <i>Salmonella</i> Enteritidis мясо пельменное «Рел»
7,097	<i>Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium «комбикорм № 16»

UDC 619.579.842.14-02

PROTEOMIC PROPERTIES OF SALMONELLA ISOLATES

N.B. Shadrova¹, O.V. Pruntova², G.S. Skitovich³

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shadrova@arriah.ru

² Head of the Testing Centre, Doctor of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: skitovich@arriah.ru

SUMMARY

The paper presents results of *Salmonella* of studying *Salmonella* isolate properties by MALDI-TOF method using MALDI Autoflex III mass-spectrometer. Microorganism identification was performed using direct loading method followed by comparison of mass spectra with the database set in the apparatus. Peaks typical of many *Enterobacteriaceae* representatives and mass to charge ratio (m/z), characterizing *Salmonella* were determined.

Key words: mass-spectrometer, MALDI-TOF, *Salmonella* bacteria.

INTRODUCTION

Salmonella pathogenic bacteria are one of the major agents of enteric infections and present great problems for public health in developed and developing countries as they cause food toxicoinfections. 1.3 billion gastroenteritis cases and 3 million deaths caused by *Salmonella* infection are registered annually.

Salmonella are transmitted mostly by livestock animals. Besides, *Salmonella* can be transmitted from animals to humans and from humans to humans. The main source of human *Salmonella* infection is animal and plant products (meat, eggs, dairy products, fruit and vegetables). The modern area of foodstuff production, the so called “organic” farming, also increases risk of food poisoning including salmonellosis [1].

Within the last decade microbial identification of protein profiles or direct protein profiling has been used more frequently together with classical, and molecular and biological methods of microbial identification. This method is competitive in such criteria as identification accuracy and specificity but it is more rapid and cost effective [2, 3, 9, 10].

Time-of-flight mass spectrometry MALDI (MALDI-TOF) is based on matrix assisted laser desorption and ionization of the tested substance followed by ion separation using time-of-flight mass-analyzer. When exposed to laser the matrix crystallized with the tested material actively absorbs laser irradiation which leads to its desorption. When transiting to gas-phase the matrix carries molecules of the tested substance and facilitates their ionization with formation of singly charged ions [7]. The method enables to perform direct mass-spectrometry of microbial cellu-

lar protein fraction (direct protein profiling), i.e. without fractionation and protein purification, and obtain highly accurate and high resolution mass-spectra, unique for this species, characterizing the tested object on the “fingerprint pattern” principle [4].

Spectra comprising a mass-range of 2–20 kDa are usually used for microbial identification. Analysis of mass-spectra of *E. coli* in this range demonstrated only 30 out of 2000 proteins, calculated basing on *E. coli* sequencing data, in spectra [11]. Most of the obtained peaks were referred to ribosomal proteins, and the rest to DNA-binding proteins and cold shock proteins. Ribosomal proteins are quite conservative and that makes them taxonomically specific. Besides, many ribosomal proteins are located in cell cytoplasm – up to the half mass of a growing cell, and their set remains unchanged not depending on external conditions and growth stage which ensures mass-spectrum reproducibility. Studies of intra- and inter-laboratory reproducibility demonstrated high reliability of MALDI-TOF method [2].

The study was aimed at proteomic properties of *Salmonella* isolates recovered from food products and feeds.

MATERIALS AND METHODS

Isolates. 27 *Salmonella* isolates recovered from food-stuffs and feeds in the Russian Federation by the FGBI «ARRIAH» microbiology laboratory in 2006–2010.

Matrix. Saturated CHCA solution (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) and organic solvent (basic organic solvent) –50% acetonitrile solution/2,5% trifluoroacetic acid.

Data base for «Bruker» bacteria identification contains spectra of 4,111 microorganisms including spectra of 15 *Salmonella* strains.

Cultivation. All used isolates were grown in Columbian agar (*Columbia agar base*) within 24 hours at 37°C.

Sample preparation. There was used a direct loading method where single colonies of the fresh culture were added to wells of a metal «Ground steel» Bruker plate using a sterile loop. Then matrix solution was added. Drying process took 15 minutes. The plate was put in the apparatus.

Mass-spectrometer calibration was performed prior to each experiment according to the manual [6], using *Bruker Bacterial Standard* («Bruker» Daltonik, Germany) as a calibrant.

Mass-spectrometry was performed using «MALDI Autoflex III Biotyper» (Bruker Daltonik, Germany) mass-spectrometer in linear mode. Analysis parameters were optimized for mass range of 2000–20137 m/z (mass/time), spectrum obtained as a result of summing 10 singular spectra was recorded. Method for microorganism detection, «MBT_MC» software, was used for *Salmonella* identification. FlexControl, MALDI biotyper version 3.0 and MALDI Biotyper RTC («Bruker» Daltonik, Germany) were used for recording, processing and analysis of obtained mass-spectra.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacteria from the FGBI «ARRIAH» strain museum identified as *Salmonella* bacteria according to bio-chemical characteristics and serotyped according to the Kauffman-White classification were selected for proteomic property studies (Table 1).

Table 1
Identification of *Salmonella* isolates using protein profiling method

Nº	Isolate name	MALDI result	Identification criteria, Ig*	Peak, intensity 100%, Da
1	<i>Salmonella</i> Typhimurium (beef № 4975)	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,344	6092
2	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Bashkiria»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,579	4363
3	<i>Salmonella</i> Typhimurium «dumplings No 1904»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,511	6092
4	<i>Salmonella</i> Brezany	<i>Salmonella</i> st anatum	2,559	6092
5	<i>Salmonella</i> California	<i>Salmonella</i> st anatum	2,574	6092
6	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Ru 3»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,488	6092
7	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Len»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,574	4364
8	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Gleb»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,423	6092
9	<i>Salmonella</i> Newland duck	<i>Salmonella</i> st anatum	2,591	6093
10	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Il»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,445	4364
11	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Yub»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,442	6092
12	<i>Salmonella</i> Typhimurium «k/k16»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,509	6092
13	<i>Salmonella</i> Typhimurium «k/k 7»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,509	6096
14	<i>Salmonella</i> Virchow pork 31	<i>Salmonella</i> st anatum	2,506	6093
15	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Mordova»	<i>Salmonella</i> sp. enterica st Hadar	2,348	4364
16	<i>Salmonella</i> Enteritidis Meat for dumplings (chicken) «Ri 1»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,473	6091
17	<i>Salmonella</i> Enteritidis Meat for dumplings «Pel»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,482	6092
18	<i>Salmonella</i> Moscow «Radon» feedstuff	<i>Salmonella</i> sp. enteritidis	2,477	6091
19	<i>Salmonella</i> Dublin «Rassvet»	<i>Salmonella</i> sp. enterica st dublin	2,536	6093
20	<i>Salmonella</i> Saintpaul	<i>Salmonella</i> st anatum	2,649	6092
21	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Krasnodar»	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,247	4363
22	<i>Salmonella</i> S.W	<i>Salmonella</i> sp. enteritidis	2,408	6090
23	<i>Salmonella</i> Choleraesuis № 2 «Tambov»	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,457	6092
24	<i>Salmonella</i> Choleraesuis Pork «Tatarstan»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,528	6092
25	<i>Salmonella</i> Dublin «Kolchugino»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,654	6092
26	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Ulyanovsk»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,419	6092
27	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Vladimir»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,523	4364

* 2,300–3,000 – high probability of species identification;
2,000–2,299 – guaranteed genus identification, probable genus identification;
1,700–1,999 – probable genus identification.

Due to the fact that microorganism database in the apparatus includes only 13 *Salmonella* serotypes and according to the Kauffman-White classification there are more than 2,600 of *Salmonella* serotypes in the present time the results of MALDI identification related to serotype determination can differ from results of classical serotyping.

Bacteria identification using direct protein method [5, 7] confirmed that all tested microorganisms belong to the *Salmonella* genus (Table 1). Herewith, microorganism identification criterion was within 2,236–2,649, which is indicative of high probability of identification.

Within the process of bacteria identification using MALDI-TOF method protein profiles were constructed for all *Salmonella* bacteria. They enabled determination of typical high intensity peaks.

It was determined that 6 out of 27 studied *Salmonella* isolates demonstrated a typical peak with 100% intensity and m/z 4364 Da in a protein spectrum. For all the rest isolates identification peak was at 6092 Da.

According to Zhou N. and Wang N. [12] a unique peak characterizing *Salmonella paratyphi*, is peak at m/z 6092 Da. In our test such peak was shown by all *Salmonella* isolates together with peak at 4363 Da.

Performed mass-spectrometry of *Enterobacteriaceae* family representatives demonstrated in Maldi Biotyper database (Table 2) determined that peak 4363±1 Da is typical of many representatives of *Enterobacteriaceae* family, while peak at m/z 6092±1 Da is typical only of *Salmonella* и *Trabulsiella guamensis* bacteria. *Trabulsiella* bacteria were discovered in 1985 and originally were referred to *Salmonella* genus due to proximity of biochemical characteristics [8].

So, peak at m/z 6092 Da can be considered unique for *Salmonella* bacteria, and this information can be used when developing express-methods for microorganism detection immediately from material substance without preliminary isolation of pure cultures.

Besides, peaks used to characterize the microorganism's family and genus, according to data presented by Dieckmann R. and Marlony B. [5], peaks typical of 5 epidemically important *Salmonella* serotypes: Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis, Hadar, were determined. Furthermore, there were determined potential serovar-determining ions, which can be used as biomarkers for serotypes Choleraesuis, Heidelberg, Gallinarum (Table. 3). Obtained results confirm R. Dieckmann and B. Malorny's conclusion [5] as far as Choleraesuis (*Salmonella* Choleraesuis «Bashkiria», *Salmonella* Choleraesuis «Il», *Salmonella* Choleraesuis «Len», *Salmonella* Choleraesuis «Mordovia», *Salmonella* Choleraesuis «Vladimir») and Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis «Ru 3», *Salmonella* Enteritidis «Gleb», *Salmonella* Enteritidis «Pel») serotypes are concerned (Table. 3).

It was noted that *Salmonella* Dublin «Rassvet» isolate showed peak at m/z 6008 Da, typical of Virchow serotype, and out of four studied isolates, determined as Typhimurium by agglutination test, only one *Salmonella* Typhimurium «K/K № 16» isolate showed typical peak at m/z 7097 Da.

CONCLUSION

As a result of performed tests it was determined that peak at m/z 4364 Da (typical of *Enterobacteriaceae* bacteria) and 6092 Da (unique for *Salmonella* bacteria) are typical of all studied *Salmonella* isolates. Results obtained in

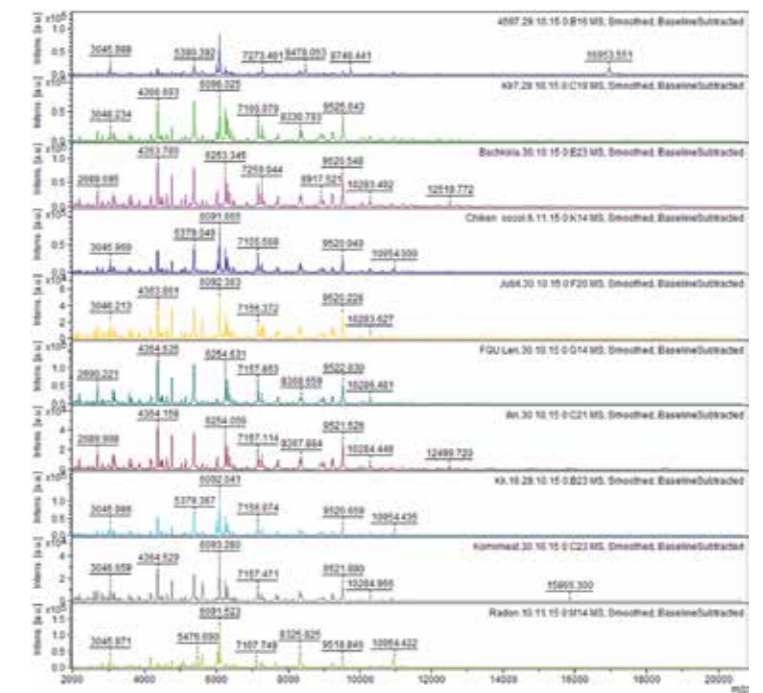


Fig. Protein profiles of *Salmonella* isolates
X axis shows m/z, Y axis shows relative peak intensity, recorded during mass-spectrometry analysis.

studying proteomic characteristics of different *Salmonella* serotypes confirm R. Dieckmann and B. Malorny's conclusion on peaks typical of Choleraesuis and Enteritidis serotypes but not typical of *Salmonella* Typhimurium isolates.

REFERENCES

- Bhunja A.K. Pathogenic microorganisms in food products. – Saint-Petersburg: Professia, 2014. – 344 p.
- Time-of-light MALDI mass-spectrometry for microorganism identification / Ye.A. Demidov, K.V. Starostin, V.M. Popik, S.Ye. Peltek // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2013. – Vol. 17, № 4/1. – P. 758–764.
- Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry // Analytical Chemistry. – 1975. – Vol. 47. – P. 219–225.
- Ben L.M., van Baar Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – Vol. 24, № 2. – P. 193–219.
- Dieckmann R., Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars using Whole-Cell MALDI-TOF mass spectrometry // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, № 12. – P. 4136–4146.
- MALDI Biotyper User Manual 2008, Version 2.0. SR1; Bruker Daltonik Inc.: Bremen, Germany, 2008. – 130 p.
- Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of non-volatile compounds / M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillencamp // Int. J. Mass Spectrom. Ion. Process. – 1987. – Vol. 78. – P. 53–68.
- McWhorter A., Haddock R, Nocon F. *Trabulsiella guamensis*, a new genus new species of the family *Enterobacteriaceae* that resembles *Salmonella* subgroups 4 and 5 / J. Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 29. – P. 1480–1485.

Table 2
Typical peaks shown by different representatives of *Enterobacteriaceae* family

Representatives of <i>Enterobacteriaceae</i> family	Peaks of <i>Enterobacteriaceae</i>		Representatives of <i>Enterobacteriaceae</i> family	Peaks of <i>Enterobacteriaceae</i>	
	4363±1 Da	6092±1 Da		4363±1 Da	6092±1 Da
<i>Arsenophonus</i>	-	-	<i>Morganella</i>	n/d	-
<i>Biostraticola</i>	n/d*	-	<i>Obesumbacterium</i>	n/d	-
<i>Brenneria</i>	-	-	<i>Pantoea</i>	-	-
<i>Buchnera</i>	n/d	-	<i>Pectobacterium</i>	-	-
<i>Budvicia</i>	-	-	<i>Phaseolibacter</i>	n/d	-
<i>Buttiauxella</i>	-	-	<i>Photorhabdus</i>	-	-
<i>Cedecea</i>	-	-	<i>Plesiomonas</i>	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	<i>Pragia</i>	-	-
<i>Cosenzaea</i>	n/d	-	<i>Proteus</i>	-	-
<i>Cronobacter</i>	-	-	<i>Providencia</i>	-	-
<i>Dickeya</i>	4363	-	<i>Rahnella</i>	-	-
<i>Edwardsiella</i>	-	-	<i>Raoultella</i>	4364	-
<i>Enterobacter</i>	4364	-	<i>Saccharobacter</i>	n/d	-
<i>Erwinia</i>	4362	-	<i>Salmonella</i>	4363	6092
<i>Escherichia</i>	4364	-	<i>Samsonia</i>	-	-
<i>Ewingella</i>	4364	-	<i>Serratia</i>	-	-
<i>Gibbsiella</i>	n/d	-	<i>Shigella</i>	n/d	-
<i>Hafnia</i>	-	-	<i>Shimwellia</i>	4364	-
<i>Klebsiella</i>	4363	-	<i>Sodalis</i>	-	-
<i>Kluuyvera</i>	-	-	<i>Tatumella</i>	-	-
<i>Leclercia</i>	-	-	<i>Thorsellia</i>	n/d	-
<i>Leminorella</i>	-	-	<i>Trabulsiella</i>	4363	6093
<i>Lonsdalea</i>	n/d	-	<i>Wigglesworthia</i>	n/d	-
<i>Mangrovibacter</i>	n/d	-	<i>Xenorhabdus</i>	4364	-
<i>Moellerella</i>	-	-	<i>Yersinia</i>	-	-
			<i>Yokenella</i>	4364	-

n/d – no database

Table 3
Proteomic characteristics of *Salmonella* serotypes

Mass (m/z)	Serotype characteristics (according to R. Dieckmann и B. Malorny)	<i>Salmonella</i> isolate identification with «MALDI Autoflex III Biotyper»
6,008	<i>Virchow</i>	<i>Salmonella</i> Virchow pork № 31 <i>Salmonella</i> Dublin «Rassvet»
6,022	<i>Choleraesuis</i>	<i>Salmonella</i> Choleraesuis pork «Bashkiriya» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Il» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Len» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Mordovia» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Vladimir»
6,036	<i>Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Ru 3» chick <i>Salmonella</i> Enteritidis «Gleb» chicks <i>Salmonella</i> Enteritidis meat for dumplings «Pel»
7,097	<i>Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium «feedstuff № 16»

9. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry / K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1988. – Vol. 2, № 8. – P. 151–153.

10. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry / S.B. Barbuddhe, T. Maier, G. Schwarz [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74, № 17. – P. 5402–5407.

11. Ryzhov V., Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells // Analyt. Chem. – 2001. – Vol. 73, № 4. – P. 746–750.

12. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media / N. Zhou, N. Wang, B. Xu [et al.] // Science China Life Sciences. – 2011. – Vol. 54, № 1. – P. 48–53.

УДК 619:614.31:637:579.842.14

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА САЛЬМОНЕЛЛА

Г.С. Скитович¹, К.В. Серова², Н.Б. Шадрова³, О.В. Прунтова⁴

¹ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: skitovich@arriah.ru

² ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: serova@arriah.ru

³ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shadrova@arriah.ru

⁴ руководитель Испытательного центра, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты оценки продуктивности и селективности хромогенных питательных сред (висмут-сульфитный агар и ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар) зарубежного и отечественного производств. Коэффициент продуктивности ксилозо-лизинового дезоксихолатного агара зарубежного и отечественного производств составил более 0,58, селективность не менее 2 lg. Коэффициент продуктивности висмут-сульфитного агара зарубежного производства был выше продуктивности висмут-сульфитного агара отечественного производства и составил более 0,19. Селективность данных сред одинакова и равна 5 lg. На основании полученных результатов для проведения исследований по выявлению бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах рекомендовано использование висмут-сульфитного агара импортного производства, ксилозо-лизинового дезоксихолатного агара отечественного или зарубежного производств.

Ключевые слова: *Salmonella*, питательные среды, селективность, продуктивность.

UDC 619:614.31:637:579.842.14

COMPARATIVE EVALUATION OF MEDIA USED FOR DETECTION OF SALMONELLA SPP.

G.S. Skitovich¹, K.V. Serova², N.B. Shadrova³, O.V. Pruntova⁴

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: skitovich@arriah.ru

² Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: serova@arriah.ru

³ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shadrova@arriah.ru

⁴ Head of Testing Centre, Doctor of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pruntova@arriah.ru

SUMMARY

The paper demonstrates evaluation results for productive and selective capacities of domestic and imported chromogenic nutrient media (Bismuth sulphite agar and xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar)). The productivity ratio of imported and domestic XLD agar amounted to over 0.58 and selectivity ratio – to less than 2 lg. The productivity ratio of imported Bismuth sulfate agar was higher than the productivity of the domestic one and amounted to over 0.19. The selective properties of the both media are similar and amount to 5 lg. Based on the evidence found, imported Bismuth sulfate agar and domestic or imported XLD agar can be recommended for use in the experiments for detection of *Salmonella* spp in food products.

Key words: *Salmonella*, nutrient media, selective capacity, productivity.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, по-прежнему остаются одной из основных проблем здравоохранения. Несмотря на то, что в настоящее время разработано большое количество ускоренных методов обнаружения микроорганизмов, в том числе геном бактерий можно обнаружить с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), методом, подтверждающим выявление сальмонелл при оценке пищевой безопасности пищевых продуктов, является бактериологический анализ. Традиционное выделение бактерий при росте на питательных средах с последующим определением их биологических свойств остается основой идентификации пищевых патогенов. Это позволяет точно определить вид бактерии и тестировать антимикробную восприимчивость, что имеет решающее значение для борьбы с болезнями [2, 6].

В пищевых продуктах, контаминированных сальмонеллами, последние могут присутствовать в относительно низких количествах, обычно распределяясь неравномерно. Они могут быть повреждены в ходе переработки пищевых продуктов или под действием внутренних для данного продукта факторов, таких как температура продукта, pH, влажность, и, кроме того, сальмонеллам обычно сопутствует большое количество близкородственных бактерий, конкурирующих с ними за питательные вещества [9]. Все это затрудняет выделение бактерий рода *Salmonella* из проб пищевых продуктов с помощью культуральных методов. Были разработаны разнообразные селективные среды, которые применяются для визуализации простых биохимических функций, таких как отсутствие ферментации лактозы и производства сероводорода, чтобы определить бактерии рода *Salmonella* в образцах. Данные среды характеризуются низкой специфичностью и требуют достаточно много времени, чтобы исключить колонии значимых организмов от сопутствующих с аналогичными биохимическими функциями [4].

Попытки усовершенствовать состав питательных сред с целью распознавания колоний целевых микроорганизмов от других представителей сопутствующей микробиоты привели к разработке питательных сред с включением хромогенных субстратов. По сравнению с обычными селективными средами, хромогенные питательные обладают более высокой специфичностью, но более низкой чувствительностью из-за увеличения числа ложноотрицательных результатов [7, 8]. Например, хромогенный Rambach агар является высокоспецифичной средой для сальмонелл, но не обнаруживает *Salmonella enterica* серовар Turphi [9]. В результате оптимальная среда для выделения всех серотипов *Salmonella* еще не разработана. Это означает, что необходимо использовать параллельно не менее двух сред для посева на чашки.

Неспособность сбрасывать лактозу, продуцирование сероводорода и подвижность являются характерными признаками сальмонелл, используемыми во многих существующих средах для выделения. Одной из таких сред является ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар (XLD). Тем не менее, примерно 1% сальмонелл способны сбрасывать лактозу, причем описаны пищевые отравления человека, вызванные этими штаммами. Чтобы не пропустить лактозо-положительные штаммы, для посева на чашки рекомендуют использовать лактозо-независимую среду [5]. В нашем случае использовали висмут-сульфитный агар (VSA).

Целью работы была оценка питательных сред XLD и VSA импортного и отечественного производства по следующим микробиологическим критериям качества: типичность морфологических, культуральных характеристик микроорганизма на исследуемых средах, чувствительность (продуктивность среды) и селективность питательных сред для выявления бактерий рода *Salmonella*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и питательные среды: дистиллированная вода по ГОСТ ISO/TS 11133-1-2014; набор красителей для окрашивания мазков по Граму (Merck, Германия); иммерсионное масло; натрий хлористый по ГОСТ 4233; 70%-ный раствор этилового спирта; мясо-пептонный агар (МПА, отдел подготовки питательных сред ФГБУ «ВНИИЗЖ»); триптозо-соевый агар (TSA, Scharlau, Испания); ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар (XLD (имп.), Merck, Германия); ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар (XLD (отеч.), Оболенск, РФ); висмут-сульфитный агар (VSA (имп.), Merck, Германия); висмут-сульфитный агар (VSA (отеч.), Оболенск, РФ). Все питательные среды были приготовлены согласно инструкции изготовителя. Перед использованием все среды подвергали полному качественному контролю и использовали в течение срока хранения готовых питательных сред.

Серовариантный состав сальмонелл определяли с использованием поли- и моновалентных сывороток фирмы Sifn.

Контрольные штаммы: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Salmonella dublin* 373 ВГНКИ; *Salmonella enteritidis* 7 ВГНКИ; *Enterococcus faecalis* NCTC 13379/ATCC 51299; *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922.

Изоляты. В работе использовали 25 изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из различных пищевых продуктов и кормов при проведении микробиологических исследований за период 2006–2015 гг.

Восстановление лиофилизированной культуры. Ампулу с лиофилизированной культурой вскрывали согласно инструкции, вносили в нее 0,4–0,6 мл физиологического раствора (0,9%), перемешивали до получения однородной микробной взвеси и высевали на скошенную поверхность МПА и МПБ с 1% глюкозой. Посевы инкубировали при 35–37°C в течение 18–20 ч. Далее отдельную типичную колонию 1-го пассажа переносили в пробирку с питательным бульоном, перемешивали и пересевали в 2 пробирки с МПБ с 1% глюкозой и на скошенную поверхность МПА. Выросшую на питательном агаре культуру проверяли на соответствие культуральных, морфологических и биохимических свойств.

Восстановленную культуру использовали для проведения внутрилабораторного контроля питательных сред.

Приготовление исходного и рабочего разведений. С помощью денситометра приготовили исходные разведения контрольных штаммов, равные 10⁸ КОЕ/см³, что соответствует 0,5 единицы по МакФарланду. Далее десятикратными разведениями доводили концентрации микроорганизмов до необходимых для работы.

Определение селективности питательных сред. Для испытаний питательных сред на селективность в чашки со средами TSA, VSA (имп.), VSA (отеч.), XLD (имп.), XLD (отеч.) инокулировали по 0,1 мл суспензий нецелевых микроорганизмов (*Enterococcus faecalis*

Таблица 1

Рост нецелевых микроорганизмов на эталонной среде TSA и селективных питательных средах для выявления бактерий рода *Salmonella* (n=3)

Нецелевые микроорганизмы	Питательные среды					
	TSA	VSA (имп.)	VSA (отеч.)	XLD (имп.)	XLD (отеч.)	
<i>Enterococcus faecalis</i> , КОЕ/г	10 ⁷	>300	7±2,7	14±5,9	3±5,7	34±9,1
	10 ⁶	>300	0	0	0	3±5,7
	10 ⁵	>300	0	0	0	0
	10 ⁴	>300	0	0	0	0
	10 ³	195±22,2	0	0	0	0
<i>E. coli</i> , КОЕ/г	10 ⁷	>300	44±12,1	21±3,5	295±42,2	215±23,6
	10 ⁶	>300	6±5,7	0	144±51,3	156±32,1
	10 ⁵	>300	0	0	6±5,7	23±20,8
	10 ⁴	>300	0	0	0	3±5,7
	10 ³	223±56,4	0	0	0	0
10 ²	16±11,3	0	0	0	0	

NCTC 13379/ATCC 51299, *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922), содержащих от 10² до 10⁷ КОЕ. Чашки инкубировали в термостате в течение 24–48 ч при температуре (37±1)°C. После этого проводили визуальный контроль и количественный подсчет выросших колоний. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Параллельно осуществляли контроль концентрации приготовленных инокулюмов путем посева на плотную неселективную питательную среду МПА.

Фактор селективности (S_F) вычисляли по формуле:

$$S_F = D_O - D_{S'} \quad (1)$$

где D_O — наибольшее разбавление, при котором отмечается рост по меньшей мере 10 колоний на эталонной среде, выраженное в lg;

D_S — наибольшее разбавление, демонстрирующее сопоставимый рост на испытываемой среде, выраженное в lg.

Определение продуктивности питательных сред. Продуктивность питательных сред определяли по наибольшему разведению, обеспечивающему формирование колоний или визуально видимый рост во всех засеянных чашках. В чашки со средами TSA, VSA (имп.), VSA (отеч.), XLD (имп.), XLD (отеч.) инокулировали по 0,1 мл суспензий целевых микроорганизмов. Инкубировали в термостате в течение 24–48 ч при температуре (37±1)°C. Инокуляты трех сероваров *Salmonella* использовали с концентрацией 10² КОЕ/см³. После этого проводили визуальный контроль и количественный подсчет выросших колоний. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Коэффициент продуктивности рассчитывали по формуле:

$$P_R = \frac{N_S}{N_O} \quad (2)$$

где N_S — общее количество колоний, полученных на данной питательной среде при испытании;

N_O — общее количество колоний, полученных на определенной эталонной среде.

Статистическая обработка результатов. При статистической обработке данных и результатов исследований использовали методы, рекомендованные И.П. Ашмариним, Н.Н. Васильевым и В.А. Амбросовым [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка селективности питательных сред. Для определения селективных свойств питательных сред отечественного и импортного производств использовали штаммы как целевого микроорганизма, проявляющего характерный рост на исследуемой селективной среде, так и нецелевых микроорганизмов, рост которых на селективных средах должен частично или полностью подавляться.

В качестве эталона питательной среды в опыт была взята среда TSA. В качестве испытываемых питательных сред использовали XLD (имп.), XLD (отеч.), VSA (имп.), VSA (отеч.).

Таблица 2

Селективность питательных сред для выявления бактерий рода *Salmonella*

Питательная среда	Фактор селективности, (lg) при культивировании следующих нецелевых микроорганизмов	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. coli</i>
VSA (имп.)	5	5
VSA (отеч.)	5	5
XLD (имп.)	5	3
XLD (отеч.)	4	2

Таблица 3
Рост контрольных штаммов бактерий рода *Salmonella* на эталонной среде и селективных питательных средах (n=3)

Среда	<i>S. typhimurium</i> , КОЕ/см ³		<i>S. enteritidis</i> , КОЕ/см ³		<i>S. dublin</i> , КОЕ/см ³	
	10 ³	10 ²	10 ³	10 ²	10 ³	10 ²
TSA	986±80,21	60±26,46	870±141,06	103±15,27	566±92,91	40±26,46
VSA (имп.)	946±37,86	83±30,55	243±153,73	20±10,00	300±194,68	36±25,17
VSA (отеч.)	н/р*	н/р	16±15,27	н/р	63±58,59	6±5,77
XLD (имп.)	833±95,04	70±17,32	686±100,16	80±10,00	546±90,74	46±20,82
XLD (отеч.)	926±45,09	133±53,86	696±35,12	90±40	426±90,18	23±15,27

н/р — нет роста.

Таблица 4
Проверка правильности выбранной концентрации на питательной среде МПА

Разведение инокулюмов с исходной концентрацией 10 ⁸ КОЕ/см ³	<i>S. typhimurium</i> , КОЕ/см ³			<i>S. enteritidis</i> , КОЕ/см ³			<i>S. dublin</i> , КОЕ/см ³		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Повтор 1	270	20	0	150	20	0	150	0	0
Повтор 2	230	30	0	130	80	0	170	10	0
Концентрация инокулюмов	2,5×10 ⁸ КОЕ/см ³			3,2×10 ⁸ КОЕ/см ³			1,4×10 ⁸ КОЕ/см ³		

Таблица 5
Продуктивность селективных питательных сред для выявления бактерий рода *Salmonella*

Питательные среды	Коэффициент производительности селективных сред при посеве следующих целевых микроорганизмов, посевная концентрация 10 ² КОЕ/см ³		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. dublin</i>
VSA (имп.)	1,38	0,19	0,90
VSA (отеч.)	0	0	0,15
XLD (имп.)	1,16	0,78	1,15
XLD (отеч.)	2,21	0,87	0,58

Общеизвестно, что VSA — строго селективная среда для выявления сальмонелл [2]. Полученные результаты, представленные в табл. 1, подтверждают, что из всех

испытываемых питательных сред рост нецелевой микрофлоры в максимальной концентрации (10⁶ КОЕ/см³) ингибировал VSA отечественного производства, содержащий в своем составе в качестве ингибитора висмут сульфит. VSA импортного производства сдерживал рост микрофлоры в концентрации 10⁵ КОЕ/см³.

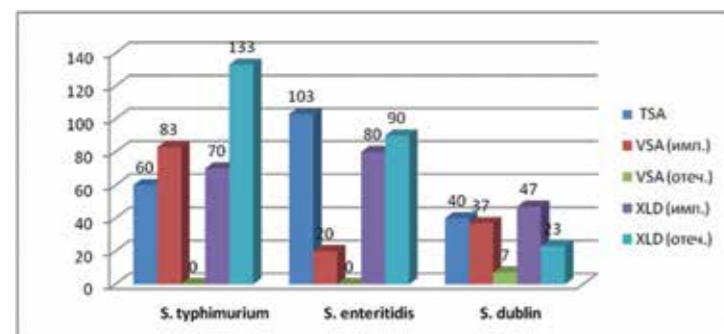
Ингибитором банальной микрофлоры в составе XLD является бриллиантовый зеленый. По полученным данным, XLD как импортного, так и отечественного производства существенно уступает по ингибирующим свойствам VSA, так как подавляет рост нецелевых микроорганизмов в концентрации 10³ КОЕ/см³. Причем среда XLD (отеч.) по результатам исследования показала селективность ниже, чем среда XLD (имп.).

На основании полученных результатов для каждой испытываемой среды по формуле 1 был подсчитан фактор селективности. Результаты представлены в табл. 2.

В соответствии с ГОСТ ISO 11133-2-2011 фактор селективности нецелевых микроорганизмов на селективной среде должен быть не менее двух [3]. По результатам проведенных экспериментов, почти на всех исследуемых средах для выявления бактерий рода

Рис. 1. Рост контрольных штаммов бактерий рода *Salmonella* на селективных питательных средах, посевная концентрация 10² КОЕ/см³

По шкале ординат отложены значения КОЕ/см³ для штаммов *Salmonella* в посевной концентрации 10² КОЕ/см³.



Salmonella фактор селективности был больше или равен 2 Ig, что подтверждает их селективные свойства. Причем наиболее высокой селективностью (фактор селективности 5 Ig) обладали среды VSA как импортного, так и отечественного производства. Самый низкий фактор селективности (2 Ig) был определен для среды XLD (отеч.) при культивировании нецелевого микроорганизма *E. coli*.

Продуктивность питательных сред. Продуктивность питательных сред определяли по наибольшему разведению, обеспечивающему формирование колоний или визуально видимый рост во всех засеянных чашках. В работе были использованы инокуляты трех сероваров *Salmonella* в концентрации 10² и 10³ КОЕ/см³. Посев проводили аналогично, как и при определении селективности питательных сред. Результаты представлены в табл. 3.

По результатам, полученным в ходе исследования, наименее продуктивной средой для контрольных штаммов *Salmonella* оказалась селективная питательная среда VSA отечественного производства. Так, на данной среде серовар *Typhimurium* при посевной концентрации 10² и 10³ КОЕ/см³ не показал признаков роста, серовар *Enteritidis* в концентрации 10² КОЕ/см³ также не вырос. Рост сероваров *Salmonella* на среде XLD (имп.) практически не различался, что говорит о высокой чувствительности данной среды (рис. 1).

Параллельно осуществлялся контроль приготовленных инокулюмов путем посева на плотную неселективную питательную среду МПА (табл. 4).

Полученные результаты, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что все исходные суспензии контрольных штаммов были приготовлены правильно и соответствуют 0,5 единицы по МакФарланду.

Для каждой селективной питательной среды был определен коэффициент продуктивности (табл. 5).

Коэффициент производительности (P_r) целевых микроорганизмов на селективных средах должен быть не менее 0,1 [3]. По результатам исследований видно, что при использовании *Salmonella* Dublin в качестве целевого штамма все среды имели P_r более 0,15. Самым низким P_r характеризуется среда VSA (отеч.), так как рост на данной среде сероваров *Typhimurium* и *Enteritidis* отсутствует.

Исследование ростовых свойств селективных питательных сред с использованием изолятов бактерий рода *Salmonella*. Время появления роста изолятов бактерии рода *Salmonella* на агаре XLD и VSA регистрировали уже через 12 ч инкубации появлением отчетливого, видимого невооруженным глазом роста культуры.

Все исследуемые в данной работе серовары выделяют сероводород, поэтому на агаре VSA растут в виде черных колоний, что является следствием образования сульфида железа в первые 24 ч культивирования. Восстановление ионов висмута до металлического блеска вокруг колоний через 48 ч культивирования. На VSA (отеч.) через 48 ч культивирования наблюдали более слабый рост колоний по сравнению с VSA (имп.), со слабо выраженным металлическим блеском (рис. 2).

В состав агара XLD входят лизин, ксилоза, лактоза, сахароза, феноловый красный и другие компоненты. Индикация сальмонелл проводится по черной окраске колоний, обусловленной продукцией сероводорода, который образуется только в благоприятных щелочных условиях при ферментации лизина и отсутствии (или малой интенсивности) ферментации ксилозы, лак-

тозы, сахарозы. На XLD (имп.) и XLD (отеч.) через 24 ч *Salmonella* выросла в виде розовых колоний с черным центром. Через 36 ч эти колонии уже выглядели как черные с розовым ореолом. Причем на XLD (имп.) колонии были мельче (рис. 3).

На исследуемых средах был проанализирован рост 25 изолятов *Salmonella*. Все изоляты были выделены из различных пищевых продуктов. Используя стерильные пипетки, на чашки с питательными средами инокулировали исследуемые образцы в концентрации 10² КОЕ/г. Все чашки инкубировали 24–48 ч при (37±1)°С. Бактериальный рост был оценен количественно на основании подсчета колоний (табл. 6).

Суммарный анализ роста изолятов на питательных средах оценен следующим образом: от одной до 50 колоний — слабый рост; 50–100 колоний — умеренный рост; больше чем 100 колоний — сильный рост. Полученные результаты представлены в табл. 7.

Число колоний бактерий *Salmonella* было значительно больше на XLD (имп.) и XLD (отеч.), чем на других средах. На среде XLD (имп.) 23 изолята показали умеренный и сильный рост, что указывает на большую специфичность данной среды. Меньше всего изолятов выросло на VSA (отеч.), причем основное количество изолятов показало на данной среде умеренный рост.

Рис. 2. Культура *Salmonella enterica* серовар *Dublin* на среде VSA отечественного и импортного производства после инкубации в течение 48 ч

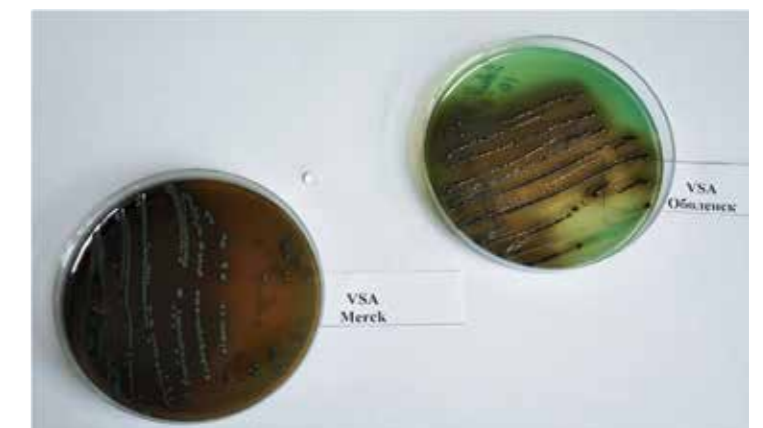


Рис. 3. Культура *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* на среде XLD отечественного и импортного производства после инкубации в течение 24 ч



Таблица 6
Качество роста изолятов бактерий рода *Salmonella* на плотных питательных средах

№ п/п	Наименование изолята	Количество колоний, посевная концентрация микроорганизмов 1×10^2 КОЕ/см ³ (n=3)				
		TSA (ср.)	XLD (имп.)	XLD (отеч.)	VSA (имп.)	VSA (отеч.)
1	<i>S. typhimurium</i> говядина № 4975	146±23,09	120±30,01	190±10,01	153±30,55	150±43,59
2	<i>S. typhimurium</i> комбикорм № 7	96±35,12	97±15,28	113±28,87	147±15,28	97±25,17
3	<i>S. typhimurium</i> пищ. продукты № 1904	80±10,01	70±10,01	83±28,87	113±40,42	87±81,45
4	<i>S. typhimurium</i> ребрышки свин. охл.	235±65,06	177±5,77	213±75,72	230±34,64	197±83,27
5	<i>S. typhimurium</i> комбикорм № 16	160±26,46	110±20,01	157±23,09	150±20,01	77±40,42
6	<i>S. choleraesuis</i> Нижегородская обл.	127±15,28	103±46,19	100±26,46	83±41,63	63±35,12
7	<i>S. choleraesuis</i> пищ. прод. Респ. Коми	243±41,63	83±35,12	70±20,01	0	0
8	<i>S. choleraesuis</i> Краснодарский край	147±35,12	137±25,17	103±15,28	133±47,26	83±20,82
9	<i>S. choleraesuis</i> Краснодар. край (19-3)	153±32,15	153±20,82	163±32,15	133±32,14	150±62,45
10	<i>S. choleraesuis</i> № 2 Тамбовская обл.	157±20,82	97±43,54	153±5,77	187±15,28	177±20,82
11	<i>S. choleraesuis</i> Владимирская обл.	120±17,32	103±5,77	113±40,42	93±15,28	30±43,59
12	<i>S. choleraesuis</i> Ульяновская обл.	287±96,09	147±32,15	110±65,57	0	0
13	<i>S. choleraesuis</i> Вологодская обл.	157±35,12	160±43,58	80±20,01	97±35,12	20±34,64
14	<i>S. choleraesuis</i> Республика Татарстан	193±35,12	60±20,01	77±15,28	0	0
15	<i>S. choleraesuis</i> Башкирия	243±90,74	167±25,17	203±11,55	187±81,46	0
16	<i>S. choleraesuis</i> Самарская обл.	233±45,09	0	0	0	0
17	<i>S. choleraesuis</i> Ленинград. обл.	157±50,33	190±17,32	217±83,27	137±58,59	0
18	<i>S. choleraesuis</i> Мордовия	174±55,07	0	0	0	0
19	<i>S. dublin</i> Владимирская обл.	120±17,32	130±34,64	170±52,92	0	0
20	<i>S. dublin</i> Владимирская. обл.	170±36,06	137±20,82	163±11,55	97±40,41	0
21	<i>S. dublin</i> Мордовия	173±20,82	93±55,07	80±17,32	13±23,09	0
22	<i>S. enteritidis</i> Московская обл.	113±66,59	67±20,82	107±51,32	6±11,55	0
23	<i>S. enteritidis</i> Краснодарский край	80±10,01	60±5,77	67±53,54	0	0
24	<i>S. enteritidis</i> от морской свинки	110±40,14	80±36,06	60±10,01	100±43,59	0
25	<i>S. enteritidis</i> пищ. продукты	123±55,07	77±15,27	43±17,32	0	0

Таблица 7
Количество изолятов бактерий рода *Salmonella*, выросших на селективных средах (%)

Результат, кол-во колоний	XLD (имп.)	XLD (отеч.)	VSA (имп.)	VSA (отеч.)
1-50	0	1 (4)	2 (8)	2 (8)
51-100	10 (40)	7 (28)	5 (20)	5 (20)
>100	13 (52)	15 (60)	10 (40)	4 (16)
Итого	23	23	17	11

Таким образом, было установлено, что на всех исследуемых питательных средах бактерии рода *Salmonella* растут в виде характерных колоний, на VSA — черные колонии с металлическим блеском и прокрашиванием среды, на XLD — в виде черных колоний, окруженных розовым ореолом без изменения цвета среды.

Лучшей селективностью обладают среды VSA как импортного, так и отечественного производства, фактор селективности в данном эксперименте был равен 5. Питательная среда XLD (отеч.) была слабо селективной, фактор селективности при культивировании нецелевого микроорганизма (в опыте — *E. coli*) равен 2.

Наибольший коэффициент производительности для целевых штаммов (сальмонелл) установлен для среды XLD (имп.) и XLD (отеч.). Самый низкий коэффициент производительности по результатам работы был определен для VSA (отеч.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для проведения микробиологических испытаний пищевых продуктов по выявлению бактерий рода сальмонелла на этапе посева для идентификации микроорганизмов необходимо применять как минимум две твердые питательные среды.

По результатам проведенной работы можно сделать вывод, что для рутинного выявления бактерий рода *Salmonella* наиболее эффективной средой является среда XLD, причем среда XLD отечественного производства не уступает по чувствительности и продуктивности среде XLD импортного производства. Для выявления лактозо-положительных сероваров бактерий рода *Salmonella* из сред, представленных в данной работе, предпочтительнее использовать среду VSA. Причем среда VSA отечественного производства уступает в качестве аналогичной среде импортного производства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. — 76 с.
- Бхуниа А.К. Патогенные микроорганизмы пищевых продуктов. — СПб.: Профессия, 2014. — 344 с.
- ГОСТ ISO 11133-2-2011. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред. — М.: Стандартинформ, 2013. — 32 с.
- Микробиологический анализ мяса, мяса птицы и яиц/под ред. Дж.К. Мид; пер. с англ. — СПб.: Профессия, 2008. — 384 с.
- BBL™ XLD Agar. Quality control procedures. — Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, 2007. — L007426, Rev. 09. — URL: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007426%2809%29%280907%29.pdf>.
- Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure / G.G. Stone [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1994. — Vol. 32, № 7. — P. 1742–1749.
- Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media // Int. J. Food Microbiol. — 2000. — Vol. 60, № 2–3. — P. 205–218.
- Park S.-H., Ryu S. Kang D.-H. Development of an improved selective and differential medium for isolation of *Salmonella* spp. // J. Clin. Microbiol. — 2012. — Vol. 50, № 10. — P. 3222–3226.
- Van der Zee H. Media for isolation of *Salmonella* // Progress in Industrial Microbiology. Handbook of Culture media for Food Microbiology / ed. J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird. — Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2003. — Vol. 37. — P. 195–208.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ИЗОТОПНЫХ ОТНОШЕНИЙ ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЦЕЛЬНОГО МОЛОКА

И.В. Подколзин¹, А.И. Соловьёв²

¹ старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: podkolzin@arriah.ru

² химик, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: solovev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

На примере 235 образцов цельного молока, собранных в различных регионах Российской Федерации, проведена оценка возможности применения масс-спектрометрии изотопных отношений легких элементов (С, N, O, H) в задаче установления географического происхождения молока в границах территории Российской Федерации. Количественная оценка возможностей метода выполнена с помощью серии статистических тестов, основанных на непараметрическом дисперсионном анализе.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, изотопные отношения, идентификация, «post-hoc»-анализ.

ASSESSING APPLICABILITY OF ISOTOPE-RATIO MASS SPECTROMETRY (IRMS) FOR GEOGRAPHICAL IDENTIFICATION OF WHOLE MILK

I.V. Podkolzin¹, A.I. Solovyev²

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: podkolzin@arriah.ru

² Chemist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: solovyev@arriah.ru

SUMMARY

Applicability of isotope-ratio mass spectrometry of light elements (C, N, O, H) has been assessed for identification of geographical origin of Russian milk collected in different parts of the Russian Federation (235 sample of whole milk). Quantitative assessment was carried out in a series of statistical tests based on nonparametric dispersion analysis.

Key words: mass-spectrometry, isotope-ratio, identification, «post-hoc»-analysis.

ВВЕДЕНИЕ

Данная работа выполнена в рамках международного научного проекта по сотрудничеству лабораторий с целью объединения усилий в разработке и создании глобальной системы идентификации географического происхождения молочной продукции, поддерживаемого Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (Food and Agriculture Organization, ФАО) и Международным агентством по атомной энергии (International Atomic Energy Agency, МАГАТЭ). Выбор молока и молочных продуктов в качестве объектов исследования обусловлен разными причинами, в числе которых огромные объемы мирового производства, высокий уровень оборота в торговле и чувствительность потребителей к фальсификации. Предполагается, что опыт, полученный при разработке системы для отслеживания происхождения молочных продуктов, будет в дальнейшем применен и к другим пищевым продуктам.

К настоящему времени изотопный анализ, в том числе в различных его вариациях и сочетаниях с другими методами исследования, был применен к целому ряду продуктов питания и пищевого сырья [10] с целью создания методического подхода, который позволит устанавливать их географическое происхождение с той или иной степенью достоверности. Следует отметить, что существует обширное множество других аналитических методов [8, 12] для проверки происхождения продуктов, таких как элементный анализ (ИСП-МС, ИСП-АЭС) [1, 2], методы «отпечатков пальцев» или так называемое химическое профилирование с применением ядерного магнитного резонанса (¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, SNIF-NMR) [4, 9, 18], инфракрасной (СИК, БИК) [7] и флуоресцентной [14, 15] спектроскопии, хроматографическое профилирование (ВЭЖХ-МС, ГХ-МС) [5, 6]. Перечисленные методы могут служить чрезвычайно мощным инструментом для решения задач идентификации происхождения. Тем не менее эти подходы имеют ограничения, и потому все они являются взаимодополняющими.

Неотъемлемой частью разработки методов идентификации является создание базы данных подлинных образцов, с которой впоследствии неизвестные образцы могут быть сравнены и идентифицированы. Установление географического происхождения молока не является исключением, однако сбор образцов из хозяйств разных стран является дорогостоящим и трудоемким этапом. В связи с этим появляется необходимость создания локальных баз данных на основе результатов исследований отдельных стран с последующей консолидацией их в единую библиотеку и внедрением в глобальную систему отслеживания пищевых продуктов (Food Traceability System).

Цель данной работы заключалась в оценке возможности применения изотопного метода (IRMS), предложенного в работах Rossmann A. и соавт. [19, 21], для установления географической принадлежности молока в границах Российской Федерации с учетом географической протяженности, климатических особенностей и условий ведения хозяйства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Средства измерений. Определение изотопных сигнатур углерода, азота, водорода и кислорода (С, N, H, O) выполняли с помощью масс-спектрометра изотопных отношений Delta V ADVANTAGE (Thermo Fisher, Герма-

ния), соединенного с элементным анализатором Flash 2000 (Thermo Fisher, Германия), оснащенного окислительным и высокотемпературным конверсионным реакторами. Автоматическое разбавление газообразных продуктов сгорания, полученных в результате сжигания или высокотемпературной конверсии пробы в элементном анализаторе, а также независимую подачу рабочих газов обеспечивали с помощью интерфейсного устройства CONFLOW IV (Thermo Fisher, Германия). Навески рабочего материала взвешивали на весах специального класса с наибольшим пределом взвешивания 6,1 г METTLER TOLEDO XP6 (Швейцария).

Вспомогательная аппаратура. Сепарацию твердой фазы проводили в центрифуге MPW 260R (MPW, Польша). Обезвоживание твердой фракции осуществляли в аппарате сублимационной сушки VirTis Benchtop 2K (SP Scientific, США) и эксикаторе по ГОСТ 25336-82.

Газы и реагенты. Двуокись углерода жидкая с объемной долей основного вещества не менее 99,8% в газовом баллоне на 10 л; поверочный нулевой газ — азот марки «Б» в газовом баллоне на 10 л; гелий газообразный марки «А» с объемной долей основного вещества не менее 99,995% в газовом баллоне на 40 л; кислород газообразный марки 5.0 с объемной долей основного вещества не менее 99,999% в газовом баллоне на 40 л; водород ОСЧ с объемной долей основного вещества не менее 99,999% в газовом баллоне на 10 л; монооксид углерода с объемной долей основного вещества не менее 99,99% в газовом баллоне на 10 л; эфир петролейный 40/70, ХЧ; оловянные «мягкие» универсальные капсулы (Thermo Scientific, Германия); кислота трифторуксусная концентрированная 99% (Sigma-Aldrich, Германия); международные сертифицированные стандарты: IAEA-152, IAEA-153, IAEA-600, IAEA-601, IAEA-CN-7 (МАГАТЭ, Вена/Зайбердорф, Австрия).

Подготовка проб. Пластиковую пробирку из полипропилена объемом 50 мл заполняли 40 мл цельного молока и к содержимому приливали 5 мл трифторуксусной кислоты. Полученную смесь плотно закрывали крышкой, перемешивали 5-кратным переворачиванием и помещали в центрифугу. Осаждение твердой фазы проводили при 5000 мин⁻¹ в течение 15 мин. Супернатант затем декантировали, осадок подвергали сублимационной сушке, предварительно заморозив образцы при минус 20°C. Удаление компонентов жирного ряда проводили путем экстракции органическим растворителем. Для этой цели навеску высушенного осадка массой около 1 г помещали в полипропиленовую коническую пробирку объемом 15 мл и приливали 5 мл петролейного эфира. Пробирку плотно закручивали и встряхивали содержимое на шейкере в течение 3 мин. Экстракт декантировали, и повторяли процедуру экстракции еще раз с новой порцией петролейного эфира. Остатки эфира удаляли в течение 10–15 мин, оставив открытые пробирки в вытяжном шкафу при комнатной температуре. Полученное сухое обезжиренное молоко (СОМ) хранили в закрытых пробирках в темноте при 5–8°C до востребования.

Параметры и настройки измерительного оборудования. Для определения δ¹³C и δ¹⁵N навеску СОМ массой 400 мкг упаковывали в оловянные капсулы 9x5 мм, вводили в окислительный реактор при 1020°C. С целью калибровки измерительного оборудования использовали инкапсулированные образцы международного стандарта IAEA-600 массой 400 мкг. В случае

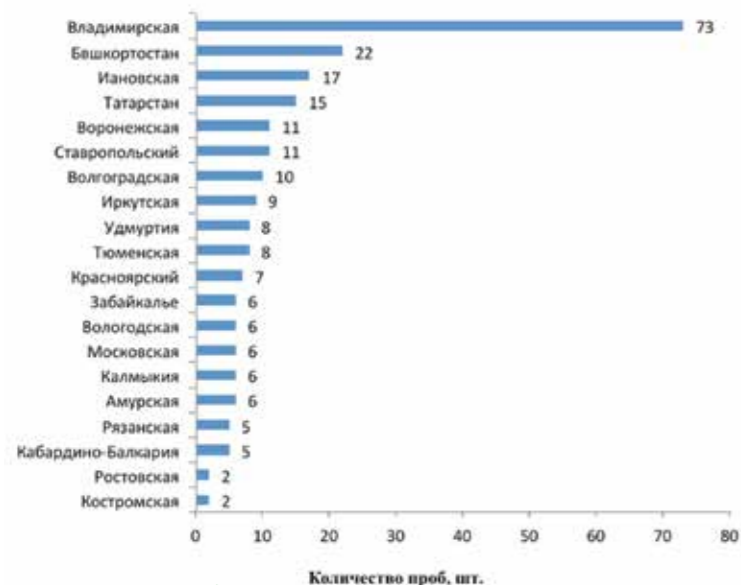


Рис. 1. Состав выборки

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы. Пробы молока были собраны в период 2013–2014 гг. Данная выборка состоит из 235 образцов, собранных на территории 65 административных районов в 20 областях РФ. Состав выборки представлен на рис. 1.

Стратегия отбора проб была разработана таким образом, чтобы по возможности покрыть территории с наибольшими объемами производства молока. Отбор проб на территории РФ осуществлялся точечно, со следующими крайними точками (в десятичных градусах):

	Широта	Долгота
Север	60.6686	46.3289
Восток	50.3587	127.9991
Юг	43.5667	43.5833
Запад	56.2179	35.6480

На рис. 2 показаны регионы отбора проб, наложенные на области с наибольшими объемами производства молока. Все доставленные в лабораторию образцы до проведения анализа хранились при температуре минус 25°C.

Определение изотопных отношений $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$ проводили в составе протеиновой фракции молока в режиме сжигания (EA-IRMS) и высокотемпературной конверсии (TC/EA-IRMS). Предварительно выделенная и высушенная протеиновая фракция обрабатывалась в соответствии с общими требованиями для измерения методом IRMS [3]. Полученные результаты затем были приведены к соответствующим международным δ -шкалам:

- VPDB — Венский стандарт Pee Dee Belemnite ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$);
- AIR — атмосферный азот ($\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$);
- VSMOW — Венский стандарт океанической воды ($\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$, $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$).

Результаты анализа представлены на рис. 3. Полученные значения δ -величины, привязанные к координатам мест отбора проб, нанесены на географическую

определения $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ навеску COM 170 мкг помещали в капсулу 6x4 мм из серебряного сплава и вводили в пиролитический реактор, разогретый до 1350°C. В качестве калибровочных стандартов применяли IAEA-600 (180 мкг) и IAEA-CH-7 (50 мкг) для кислорода и водорода соответственно.

Программное обеспечение. Первичные результаты измерений были обработаны с помощью пакета программного обеспечения ISODAT 3.0 (Thermo Electron, Германия). Статистическую обработку данных проводили с использованием свободного программного обеспечения для статистических расчетов — R версии 3.1.2 [22] с использованием следующих программных пакетов: e1071 1.6-4 [13], ggplot2 1.0.0 [24], kernlab 0.9-19 [11], lattice 0.20-29 [20], MASS 7.3-35 [23], tmap 1.2 [16], RMCMR 4.1 [17].

Рис. 2. Годовое производство цельного молока в Российской Федерации за 2013 г.

Объемы производства обозначены оттенками зеленого цвета, красным выделены регионы отбора проб.

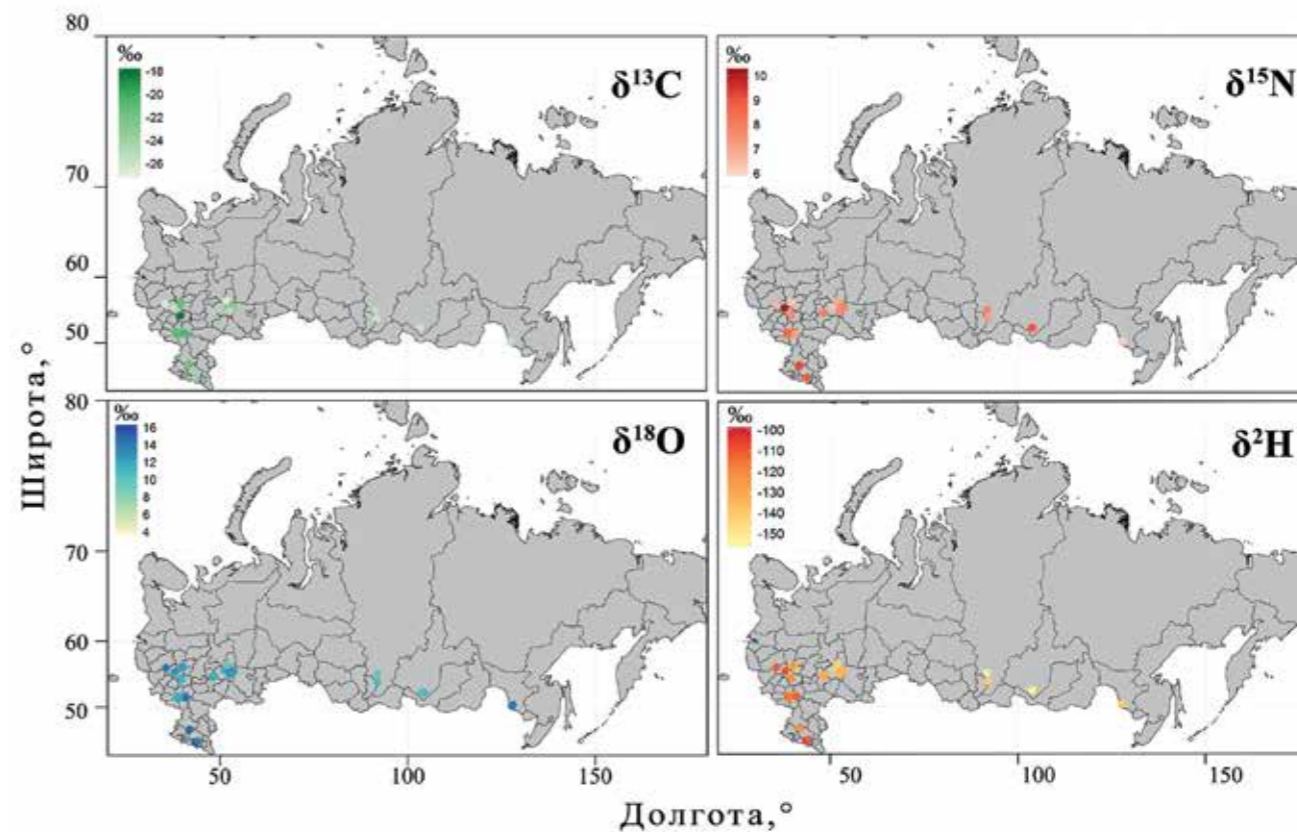
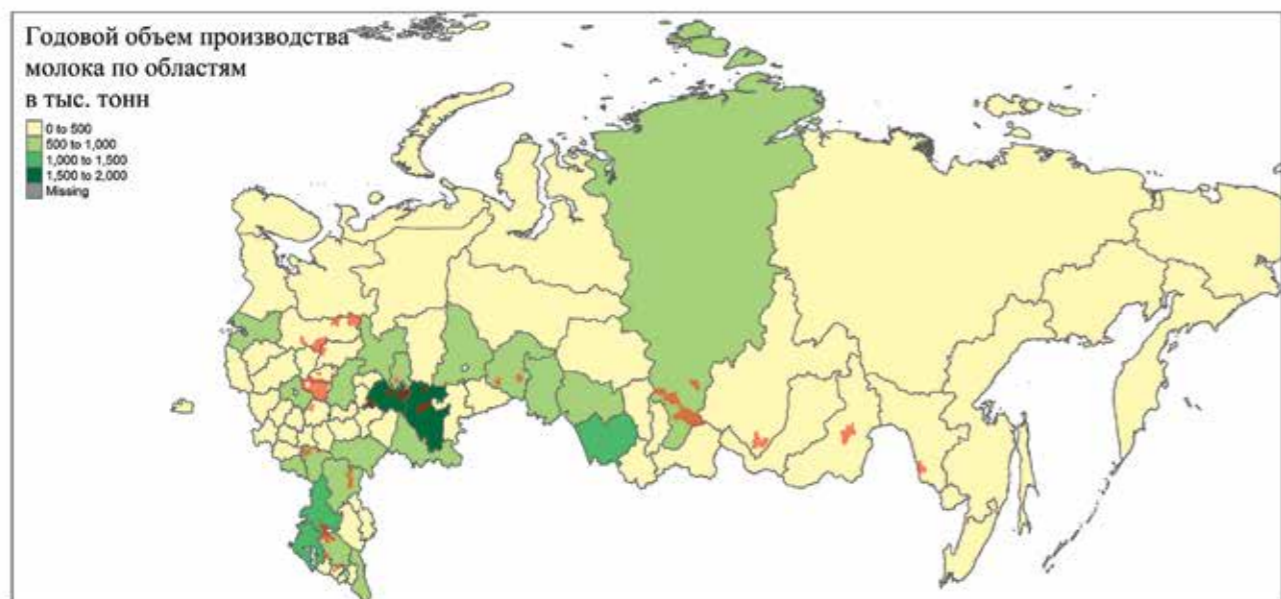


Рис. 3. Результаты определения $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$

карту. Ввиду отсутствия достаточного объема данных пространственная интерполяция значений изотопных отношений не выполнялась. Тем не менее подобная поточечная интерпретация даёт представление о плотности распределения значений величины δ на исследуемой территории.

Статистическая обработка. На основе полученных данных была выполнена первичная (промежуточная) оценка результатов. Так как в будущем предполагается проводить идентификацию неизвестных проб с помощью сравнения с набором эталонных образцов, т.е. проводить классификацию, используя в качестве входных данных результаты определения изотопных отношений, то на данном этапе целесообразно оценить эти переменные с точки зрения статистической значимости. Принимая во внимание вышесказанное, а также размер выборки и географические характеристики территории, на которой был проведен отбор проб, выполнение расчетов начали с применения кластерного анализа с целью группировки регионов по признакам сходства. Ввиду того, что существенной разницы в кластеризации между методом k -средних и EM-алгоритмом на данной выборке не выявлено, далее в расчетах использовали метод k -средних. Объединение регионов (административных районов) в группы проводили на основе географической близости пунктов отбора проб, т.е. на основе географических координат. Путем итеративного выполнения процедуры кластеризации было установлено пять уникальных групп (А-Е). Количество групп выбирали эмпирически. Состав и расположение полученных групп представлены на рис. 4.

Значимость различий между средними значениями изотопного состава между группами была оценена с помощью статистического теста. Графическое пред-

Таблица 1
Результаты теста Краскела-Уоллиса

Изотопная сигнатура	Статистика χ^2	df	p-value
$\delta^{13}\text{C}$	19,59	4	0,00060
$\delta^{15}\text{N}$	28,35	4	0,00001
$\delta^{18}\text{O}$	9,12	4	0,05823
$\delta^2\text{H}$	44,34	4	$5,5 \times 10^{-9}$

ставление величин δ с учетом вариации в группах показано на рис. 5.

Проверку на равенство средних медиальных выполняли с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа (тест Краскела-Уоллиса). Из результатов теста, представленных в табл. 1, видно, что среди пяти групп существует хотя бы одна, значительно отличающаяся от остальных по каждой переменной (изотопной сигнатуре).

Для того чтобы получить качественную и количественную характеристику различий между кластерами, проводили попарное сравнение групп — «post-hoc»-тест. Установлено, что между парами групп существует значимая статистическая разница. Исключение составляют группы, имеющие общие границы (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка возможности применения метода масс-спектрометрии изотопных отношений в решении задачи установления географической принадлежности. Несмотря на относительно небольшой объем выборки и условный выбор количества групп, было

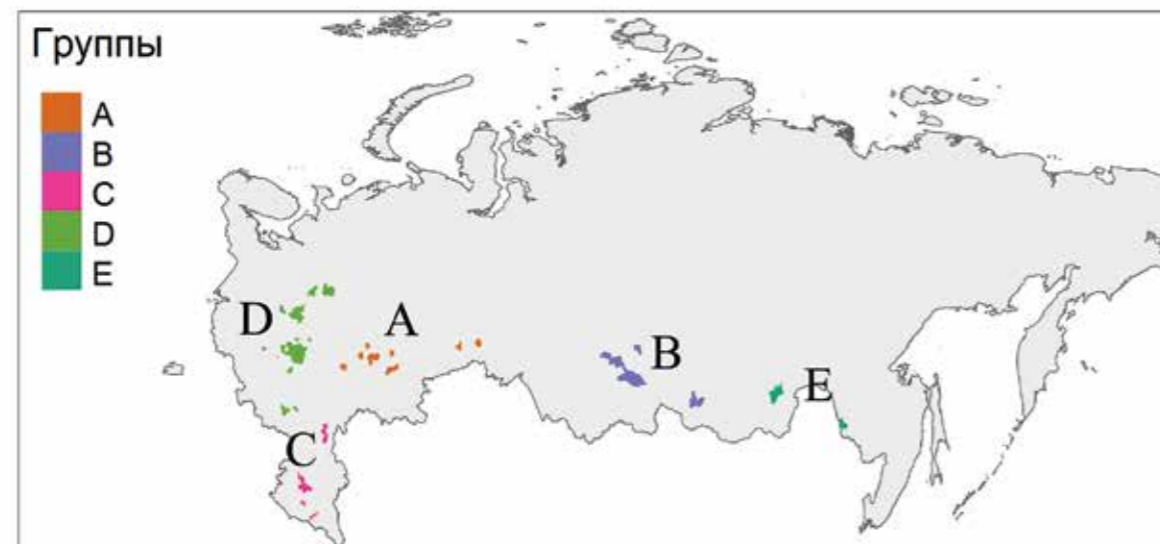
Таблица 2
Результаты «post-hoc»-теста (парное сравнение)

	$\delta^{13}\text{C}$			
	A	B	C	D
B	0,9994	-	-	-
C	0,0025	0,0250	-	-
D	0,0694	0,2703	0,6991	-
E	0,9996	0,9963	0,0376	0,2648
	$\delta^{15}\text{N}$			
	A	B	C	D
B	0,5776	-	-	-
C	0,0029	0,3955	-	-
D	0,1577	0,9923	0,5199	-
E	0,1659	0,0134	0,00002	0,0013
	$\delta^{18}\text{O}$			
	A	B	C	D
B	0,260	-	-	-
C	0,997	0,187	-	-
D	0,763	0,844	0,617	-
E	0,821	0,093	0,933	0,323
	$\delta^2\text{H}$			
	A	B	C	D
B	0,20711	-	-	-
C	0,00082	0,000001	-	-
D	0,02160	0,000023	0,75399	-
E	0,77021	0,98606	0,00073	0,01017

установлено значимое различие между кластерами, что доказано с помощью соответствующих статистических тестов.

Результаты исследования показали, что изотопные отношения C, N, O, H обладают достаточной вариацией в значениях, чтобы служить основными отличительными

Рис. 4. Группы, сформированные на основе географических координат



ми характеристиками в задаче идентификации продукции, тем самым определяя ТС/EA-IRMS в качестве базового метода. С другой стороны, комбинирование его с другими аналитическими подходами может служить надежным инструментом при подтверждении подлинности происхождения молока. Поиск дополнительных факторов (характеристик), основанных на комбинировании нескольких аналитических подходов, например, с элементным анализом, изотопным анализом компонентов и др., и создание подходящего метода расчёта открывают новые возможности при идентификации молока.

Авторы выражают глубокую признательность ФАО/МАГАТЭ за финансовую поддержку в рамках сотрудничества в международном проекте D5.20.38 (Accessible Technologies for the Verification of Origin of Dairy Products as an Example Control System to Enhance Global Trade and Food Safety).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anderson K.A., Smith B.W. Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee // J. Agr. Food Chem. — 2002. — Vol. 50, № 7. — P. 2068–2075.
- Ariyama, K., Yasui A. The determination technique of the geographic origin of welsh onions by mineral composition and perspectives for the future // JARQ-Jpn. Agr. Res. Q. — 2006. — Vol. 40, № 4. — P. 333–339.
- Carter J.F., Barwick V.J. Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry // FIRMS Network. — 2011. — URL: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Good+Practice+Guide+for+Isotope+Ratio+Mass+Spectrometry#0>.
- Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II: Beef meat / J.-P. Renou, G. Bielicki, C. Deponge [et al.] // Food Chem. — 2004. — Vol. 86, № 2. — P. 251–256.
- Characterization of milk by analysis of its terpene fractions / C. Fernandez, C. Astier, E. Rock [et al.] // Int. J. Food Sci. Tech. — 2003. — Vol. 38, № 4. — P. 445–451.
- Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses / R. Di Cagno,

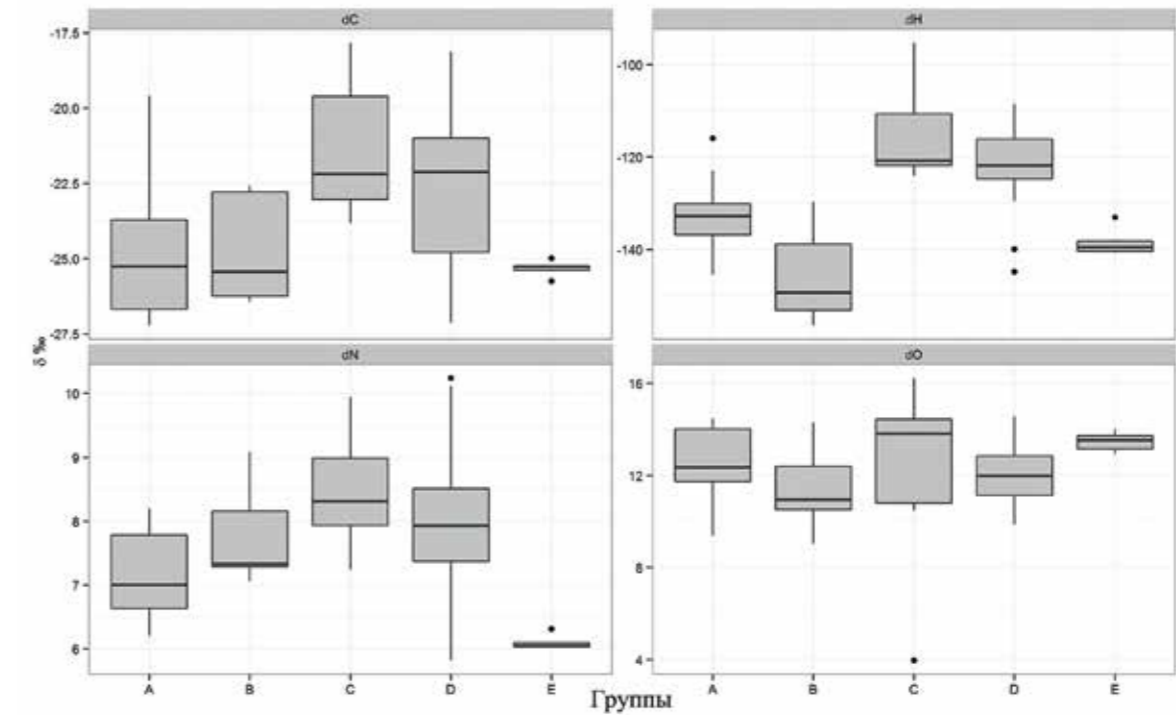
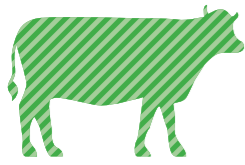


Рис. 5. Сравнение значений изотопных распространенностей по группам

J. Banks, L. Sheehan [et al.] // Int. Dairy J. — 2003. — Vol. 13, № 12. — P. 961–972.

- Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR and fluorescence spectroscopic data / R. Karoui, E. Dufour, L. Pilonel [et al.] // Eur. Food Res. Technol. — 2004. — Vol. 219, № 2. — P. 184–189.
- Food Authenticity and Traceability / ed. M. Lees. — 1st ed. — Woodhead Publishing, 2003. — 400 p.
- Ibañez E., Cifuentes A. New analytical techniques in food science // Crc. Rev. Food Sci. — 2001. — Vol. 41, № 6. — P. 413–450.
- Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis // Trends Food Sci. Tech. — 2005. — Vol. 16, № 12. — P. 555–567.
- kernlab – An {R} Package for Kernel Methods in {R} / A. Karatzoglou, A. Smola, K. Hornik, A. Zeileis // J. Stat. Softw. — 2004. — Vol. 11, № 9. — P. 10–20. — URL: <http://www.jstatsoft.org/v11/i09> (дата обращения: 17.07.15).
- Luyckx D.M.A.M., van Ruth S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products // Food Chem. — 2008. — Vol. 107, № 2. — P. 897–911.
- Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071). TU Wien / D. Meyer, E. Dimitriadou, K. Hornik [et al.]. — 2014. — e1071: — URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/e1071.pdf> (дата обращения: 17.07.15).
- Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: a preliminary investigation / R. Karoui, J.-O. Bosset, G. Mazerolles [et al.] // Int. Dairy J. — 2005. — Vol. 15, № 3. — P. 275–286.
- Monitoring the identity and the structure of soft cheeses by fluorescence spectroscopy / S. Herbert, N. Mouhous Riou, M.F. Devaux [et al.] // Le Lait. — 2000. — Vol. 80, № 6. — P. 621–634.
- Package 'tmap': Thematic Maps / M. Tennekes, J. Gombin, K. Russell, R. Zijdeman. — 2015. — URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/tmap> (дата обращения: 16.12.15).
- Pohlert T. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). — 2014. — URL: <http://cran.r-project.org/package=PMCMR> (дата обращения: 18.12.15).
- Reid L.M., O'Donnell C.P., Downey G. Recent technological advances for the determination of food authenticity // Trends Food Sci. Tech. — 2006. — Vol. 17, № 7. — P. 344–353.
- Rossmann A. Determination of stable isotope ratios in food analysis // Food Rev. Int. — 2001. — Vol. 17, № 3. — P. 347–381.
- Sarkar D. Lattice: Multivariate Data Visualization with R. — NY: Springer, 2008. — URL: Retrieved from <http://lmdvr.r-forge.r-project.org> (дата обращения: 17.07.15).
- The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter / A. Rossmann, G. Haberhauer, S. Hölzl [et al.] // Eur. Food Res. Technol. — 2000. — Vol. 211, № 1. — P. 32–40.
- The R Project for Statistical Computing / R-project.org. — URL: <http://www.r-project.org> (дата обращения: 17.07.15).
- Venables W.N., Ripley B.D. Modern Applied Statistics with S (Fourth). — NY: Springer, 2002. — URL: <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4> (дата обращения: 17.07.15).
- Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis / ed. R. Gentleman K. Hornik, G. Parmigiani. — London, NY: Springer Science+Business Media, LLC, 2009. — URL: <http://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>.



БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

УДК 619:616.98:578:636.2:616-078

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА БОЛЕЗНИ ШМАЛЛЕНБЕРГА

О.Г. Губенко¹, О.П. Бьядовская², С.В. Кононова³, Ю.Ю. Бабин⁴, Н.А. Солоухина⁵, А.В. Кононов⁶

¹ аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: gubenko@arriah.ru

² ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

³ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononova@arriah.ru

⁴ младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: babin@arriah.ru

⁵ магистрант, базовая кафедра микробиологии и вирусологии ВлГУ при ФГБУ «ВНИИЗЖ»

⁶ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты получения очищенных и концентрированных препаратов антигена вируса болезни Шмалленберга и специфических гипериммунных сывороток лабораторных животных, использованных для разработки непрямого «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа.

Ключевые слова: болезнь Шмалленберга, «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа.

UDC 619:616.98:578.826.2:616-078

PREPARATION OF SPECIFIC COMPONENTS OF ELISA TEST-SYSTEM FOR DETECTION OF SCHMALLEMBERG DISEASE VIRUS ANTIGENS

O.G. Gubenko¹, O.P. Bjadovskaya², S.V. Kononova³, Yu.Yu. Babin⁴, N.A. Soloukhina⁵, A.V. Kononov⁶

¹ Postgraduate Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: gubenko@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

³ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononova@arriah.ru

⁴ Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: babin@arriah.ru

⁵ Master's Student, affiliated Microbiology and Virology Chair of the Vladimir University at the FGBI «ARRIAH»,

⁶ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononov@arriah.ru

SUMMARY

Preparation of purified and concentrated antigens of Schmallenberg disease virus as well as specific hyperimmune sera in laboratory animals used for the development of indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is described in the paper.

Key words: Schmallenberg disease, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Шмалленберга — трансмиссивная арбовирусная инфекция крупного рогатого скота, овец и коз всех возрастных групп, характеризующаяся абортами, мертворождением, лихорадкой, истощением, снижением удоев [1].

Вирус болезни Шмалленберга относится к семейству *Bunyaviridae*, роду *Orthobunyavirus*, серогруппе Симбу (*Simbu serogroup*). Вирус имеет сферическую форму, диаметр 90–100 нм, геном представлен РНК с отрицательной полярностью, состоящей из трех сегментов: L — большого, кодирующего РНК-полимеразу (транскриптазу); S — малого, кодирующего нуклеокапсидный белок (N) и неструктурный протеин (NSm), и M — среднего, кодирующего поверхностные гликопротеины (G₁ и G₂) (рис. 1) [1, 4].

Нуклеокапсид буньявирусов организован по типу спиральной симметрии. Снаружи нуклеокапсид покрыт двухслойным липидным суперкапсидом, на котором располагаются белковые структуры с гемагглютинирующей активностью, объединённые в форме поверхностной решётки [5]. Вирусные частицы не имеют мембранного или матриксного белка.

Имеются 4 структурных белка: 2 поверхностных гетеродимера — гликопротеины G_s и G_m, которые участвуют в прикреплении, слиянии клеток и ответственны за выработку защитных антител, а также вирусный полимеразный комплекс (RNP), состоящий из L-белка и нуклеопротеина N, который отвечает за транскрипцию и репликацию вирусов [5].

Сложная структурная организация вируса создает трудности при выборе условий очистки и концентрирования вирусосодержащего материала. Поэтому в ходе работы требовалось подобрать наиболее эффективный и простой метод получения очищенного и концентрированного препарата вируса болезни Шмалленберга (ВБШ).

Для оценки иммунобиологических свойств вируса, а также для контроля качества антигенного сырья, используемого при производстве диагностических наборов, актуальной является разработка непрямого «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа (ИФА), главными достоинствами которого являются высокая чувствительность, специфичность и экспрессность.

Целью работы было получение специфических компонентов для непрямого «сэндвич»-варианта ИФА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В ходе работы по очистке и концентрированию использовали ВБШ, изолят ВН80/11-4 (полученный из Института Фридриха Леффлера, Германия), адаптированный в ФГБУ «ВНИИЗЖ» к перевиваемой линии культуры клеток почки сирийского хомяка (ВНК-СТ) и почки сайги (ПС) с титром инфекционной активности 4,0 Ig ТЦД₅₀/см³.

Получение антигена. Культуральную жидкость, содержащую вирус, очищали от балластных белков и фрагментов клеток низкоскоростным центрифугированием при 4800 в течение 40 мин, далее полученную надосадочную жидкость центрифугировали 1 ч 40 мин при 45000 g. Осадок, образовавшийся после центрифугирования, растворяли в 10 мМ трис-НСl с 100 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА (ТНЕ) буферном растворе и подвергли дальнейшему центрифугированию через слой 30% сахарозы при 106000 g в течение 2,5 ч. Полученный осадок ресуспендировали в буферном растворе ТНЕ в объеме 1/250 от первоначального, таким образом концентрируя в 250 раз. Антиген фасовали в криопробирки и хранили до использования при температуре минус 80°C.

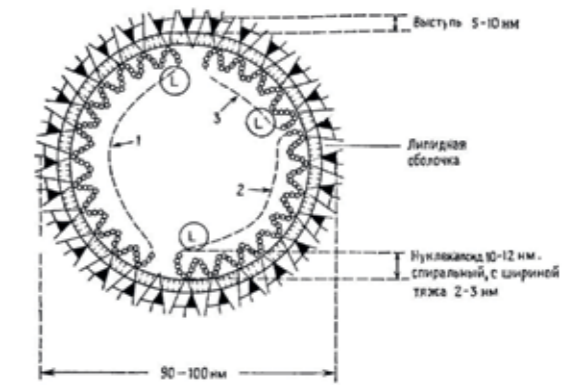


Рис. 1. Схематическое изображение структуры вириона буньявируса.

1, 2 и 3 — соответственно большая (L), средняя (M) и малая (S) молекулы РНК, связанные с молекулами белка L (компонент транскриптазы)

(<http://cyberleninka.ru/article/n/bolezni-akabane-i-shmallenberga-shodstvo-i-razlichiya>)

Электрофорез. Для оценки степени чистоты и гомогенности концентрированного препарата вируса использовали электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) [2].

Измерение концентрации белка. Концентрацию белка в препаратах антигена ВБШ измеряли по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина [2].

ПЦР-РВ. Для оценки специфичности очищенного вирусного антигена проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Нуклеиновую кислоту выделяли из 100 мкл исследуемого биологического материала с помощью набора для выделения «РИБО-сорб» («НекстБио», г. Москва) согласно инструкции изготовителя. Для выявления генома вируса Шмалленберга использовали праймеры, амплифицирующие участок S-сегмента генома. ПЦР проводили согласно методике, разработанной Bilk и соавт. [3].

Иммунизация животных. Для получения специфической сыворотки крови кроликов и морских свинок использовали препараты антигена ВБШ.

Животных (3 кроликов и 3 морских свинок) иммунизировали антигеном, эмульгированным с добавлением стерильного масляного адьюванта Montanide ISA 70, трижды с интервалом 10 и 21 суток, подкожно в область спины по 0,5 см³ на морскую свинку и по 1,0 см³ — на кролика, и обескровливали на 40–41 сутки после первой иммунизации.

Улавливающие и детекторные антитела. В качестве улавливающих и детекторных антител использовали вирусспецифические гипериммунные сыворотки крови кроликов и морских свинок, полученные при иммунизации лабораторных животных, как описано выше.

Контрольные и испытуемые образцы. В качестве отрицательных контрольных образцов использовали культуральную жидкость культуры клеток (к/кл) ПС и ВНК-СТ. В качестве положительных контрольных проб использовали вирусосодержащую суспензию культуры клеток ПС с титром инфекционной активности 3,5 Ig ТЦД₅₀/см³. Испытуемыми образцами являлись вирусосодержащие суспензии, отобранные на различных этапах очистки и концентрирования ВБШ, а также гетерологичные антигены (ротавируса, вируса инфекционного ринотрахеита, вируса вирусной диареи и вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота).

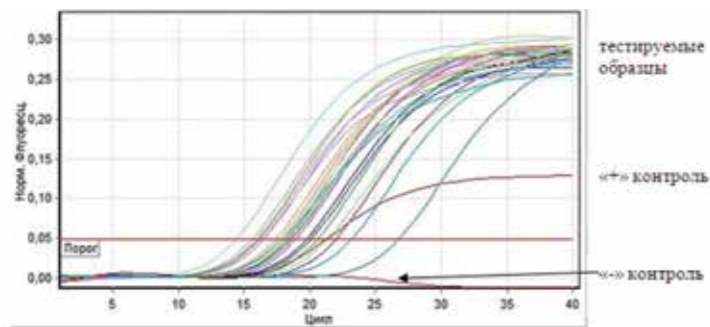


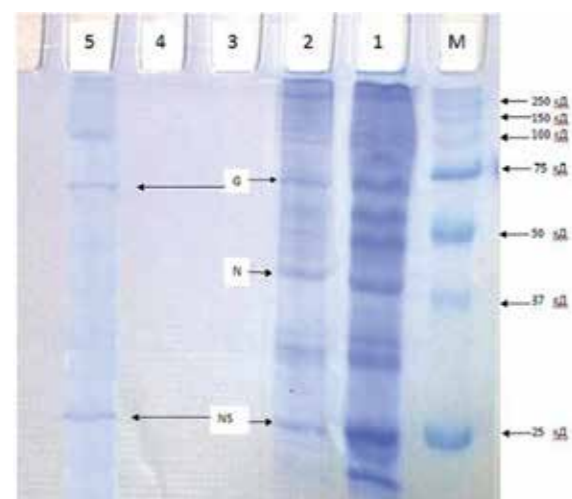
Рис. 2. Результаты выявления генома вируса болезни Шмалленберга в ПЦР-РВ

Конъюгат антивидовых антител, меченых пероксидазой хрена. Использовали коммерческий антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG морской свинки (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва).

Постановка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА. Рабочее разведение компонентов определяли в предварительных опытах путем постановки непрямого и прямого вариантов ИФА по блок-схеме («шахматный» порядок постановки). Реакцию ставили методом последовательных разведений, начиная с разведения 1:2, внося по 50 мкл соответствующих разведений антигена в лунки полистиролового планшета (Nunc, Maxi Sorp, Дания) с предварительно адсорбированными в них улавливающими антителами. Далее связавшийся антиген выявляли с помощью детекторных антител. Все компоненты реакции добавляли в объеме 50 мкл, инкубировали при температуре 37°C. Для иммобилизации улавливающих антител использовали 0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер (рН 9,5–9,6). Тестируемые и контрольные пробы, детекторные антитела, антивидовой конъюгат разводили в 1 М трис-НСl с 0,15 М NaCl буферном растворе, содержащем 0,05% Твин-20 и 0,1% сухого молока. Этот же буфер, но без добавления сухого молока, применяли для межэтапных промывок. В качестве субстрата использовали го-

Рис. 3. Результаты электрофореза

M — белковый маркер;
1, 2, 5 — препараты очищенного и концентрированного культурального вируса;
3, 4 — препараты ×100 концентрата нормальной культуры ПС и ВНК-21.



товый раствор АВТС (SIGMA). Реакцию останавливали добавлением 1% раствора додецилсульфата натрия. Учет реакции проводили спектрофотометрически при длине волны 405 нм на ИФА-ридере Sunrise (Tecan, Австрия).

Титром антигена в испытуемом образце считали его последнее разведение, в котором величина оптической плотности (ОП) двукратно превышала ОП отрицательного контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность очищенных препаратов антигена вируса болезни Шмалленберга подтверждали методом ПЦР-РВ (рис. 2) [3].

Все тестируемые в ПЦР-РВ образцы антигенов вируса имели пороговое значение (СТ) меньше 35 и были в диапазоне от 17 до 23 СТ, что свидетельствует о высоком содержании вируса в препаратах.

Для оценки степени чистоты и гомогенности концентрированного препарата вируса использовали электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) [2].

На электрофореграмме вирусных белков выявлены полосы, соответствующие фракциям белков вируса болезни Шмалленберга: G — 70 кД, N — 42 кД, NS — 26 кД, которые кодируются средней (M) и малой (S) молекулами РНК соответственно (рис. 3).

Концентрация белка в препаратах антигена вируса болезни Шмалленберга, полученная по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина (10, 5, 2,5 и 1,25 мкг белка) при длине волны 595 нм, составила 0,25–0,5 мг/мл.

Очищенный и концентрированный вирусный антиген был использован для получения специфических компонентов: гипериммунных сывороток кролика и морской свинки, используемых в качестве улавливающих и детекторных антител в ИФА. Титр антител сывороток в непрямом варианте ИФА составил 1:28000 и 1:16000 соответственно.

Разработка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА включала в себя выбор оптимального разведения улавливающих антител, определенного путем постановки непрямого варианта ИФА, которое составило 1:7000, а также детекторных антител и антивидового конъюгата, определенных в прямом варианте ИФА, в разведении 1:4000 и 1:1500 соответственно.

С использованием разработанной методики проведено исследование 50 образцов исходных культуральных антигенов ВБШ, а также вирусосодержащих суспензий, отобранных на различных этапах очистки и концентрирования. Для подтверждения результатов ИФА все исследованные пробы были протестированы методом ПЦР-РВ. Кроме того, для всех исследуемых материалов определяли титр инфекционной активности вируса методом титрования в к/кл ПС. Результаты частично представлены в таблице.

Из результатов, представленных в таблице, следует, что разработанная тест-система ИФА позволяла выявлять антиген вируса болезни Шмалленберга с титром инфекционной активности в диапазоне от 2,5 до 5,5 lg ТЦД₅₀/см³, что соответствует титру (разведению) в ИФА от 1:16 до 1:512.

При определении специфичности реакции с различными гетерологичными антигенами (ротавируса, вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота) было показано, что активность улавливающих антител к вирусу болезни Шмалленберга с гетерологичными антигенами не превышала фоновый уровень (реакция с нормальной неинфицированной культурой клеток).

Таблица

Результаты выявления антигена вируса болезни Шмалленберга в вирусосодержащих препаратах

№ пробы	Характеристика исследуемого материала	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /см ³)	ПЦР (результат)	Непрямой* «сэндвич»-вариант ИФА	
				титр	результат
1	Вирусосодержащая суспензия (ВБШ, 5 пас., к/кл ПС)	3,8	пол.	1:64	пол.
2	Вирусосодержащая суспензия (ВБШ, 3 пас., к/кл ПС)	4,0	пол.	1:128	пол.
3	Проба №3	3,0	пол.	1:32	пол.
4	Проба №4	2,5	пол.	1:16	пол.
5	Проба №5	отр.	пол.	<1:4	отр.
6	Концентрат антигена ВБШ (×100)	5,5	пол.	>1:512	пол.
7	Элюат №1	3,3	пол.	1:16	пол.
8	Элюат №2	3,0	пол.	1:16	пол.
9	Концентрат элюата №1 (×100)	4,5	пол.	1:128	пол.
10	Отрицательный контроль (культуральная жидкость нормальной неинфицированной ПС)	отр.	отр.	<1:4	отр.
11	Положительный контроль (вирусосодержащая суспензия ВБШ, 3 пас., к/кл ПС)	3,5	пол.	1:64	пол.
12	Антиген ротавируса КРС	отр.	отр.	<1:4	отр.
13	Антиген вируса инфекционного ринотрахеита КРС	отр.	отр.	<1:4	отр.

*пол. — положительно, «отр.» — отрицательно;

* результат ИФА в титрах: >1:8 — положительно, <1:4 — отрицательно;

пробы № 3–5 — надосадочная жидкость, полученная при очистке и концентрировании культуральной жидкости, содержащей вирус, в ходе центрифугирования при 4800, 45000 и 106000 g соответственно; пробы № 6–9 — антигенсодержащие суспензии (элюаты), полученные при очистке и концентрировании вирусосодержащей культуральной жидкости; пробы №10–12 — гетерологичные антигены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были получены специфические компоненты к вирусу болезни Шмалленберга, которые использовались для разработки непрямого «сэндвич»-варианта ИФА с целью контроля содержания вируса при культивировании и при производстве диагностических тест-систем.

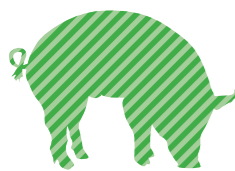
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезнь Шмалленберга: молекулярно-биологические особенности и клиническая картина / А.В. Спрыгин, А.В. Кононов, Ю.Ю. Бабин, В.А. Мищенко // Сельскохозяйственная биология. — 2012. — № 6. — С. 24–34.
2. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.

3. Nucleocapsid protein structures from orthobunyaviruses reveal insight into ribonucleoprotein architecture and RNA polymerization / A. Ariza, S.J. Tanner, C.T. Walter [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2013. — Vol. 41. — P. 5912–5926.

4. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns / S. Bilk, C. Schulze, M. Fischer, M. Beer // Vet. Microbiol. — 2012. — Vol. 159. — P. 236–238.

5. Zhang Y., Wu S., Wang J. Expression and purification of the nucleocapsid protein of Schmallenberg virus, and preparation and characterization of a monoclonal antibody against this protein // Protein Exp. Purific. — 2013. — Vol. 92. — P. 1–8.



БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ SWINE DISEASE

УДК 631.14:636.4:005.935

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ СВИНОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВ

Д.А. Лозовой¹, А.К. Караулов², К.Н. Груздев³

¹ директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

² руководитель ИАЦ, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: karaulov@arriah.ru

³ главный эксперт, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: gruzdev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В работе рассмотрены вопросы биобезопасности при ведении свиноводства на фоне обострения эпизоотической обстановки по вирусным болезням свиней, в том числе при возникновении африканской чумы свиней, история возникновения и распространения эпизоотии африканской чумы свиней по территории РФ, меры реагирования и борьбы с инфекционными болезнями свиней, разрабатываемые и принимаемые Россельхознадзором и Департаментом ветеринарии МСХ РФ. Проведена оценка эффективности этих мер и состояния отрасли свиноводства в РФ.

Ключевые слова: биобезопасность, африканская чума свиней, свиноводство, анализ, предупреждение.

UDC 631.14:636.4:005.935

BIOLOGICAL SECURITY OF PIG FARMS

D.A. Lozovoy¹, A.K. Karaulov², K.N. Gruzdev³

¹ Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lozovoy@arriah.ru

² Head of Information Analysis Centre, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: karaulov@arriah.ru

³ Chief Expert, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: gruzdev@arriah.ru

SUMMARY

The paper describes aspects of biological security in pig farming in conditions of worsening of epizootic situation associated with swine viral diseases and African swine fever (ASF) occurrence, as well as the history of ASF occurrence and spread over the RF territory, emergency and control measures against swine infectious diseases, which are developed and implemented by the Rosselkhoznadzor and Veterinary Department of the RF Ministry of Agriculture. Efficiency assessment of measures and evaluation of current situation in the field of pig farming was performed.

Key words: biological security, African swine fever (ASF), pig farming, analysis, prevention.

БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ SWINE DISEASE

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение объемов производства свинины в условиях импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны потребовало проведения структурной перестройки отрасли свиноводства с приоритетом развития промышленного свиноводства, реконструкции существующих и создания новых ферм и комплексов нового типа. Считается, что успешное развитие отрасли свиноводства и конкурентоспособность ее продукции зависят от ряда важнейших факторов, среди которых выделяют следующие: уровень селекционно-генетической работы, технология ведения свиноводства, организация кормовой базы и кормления животных с учетом современных знаний физиологии питания свиней, высокий уровень ветеринарной и зооигиенической культуры на свиноводческих предприятиях. Анализ публикаций на эту тему свидетельствует о недостаточности внимания, которое уделяется биологической безопасности (биобезопасность) свиноводческих хозяйств в условиях напряженной эпизоотической обстановки по особо опасным болезням свиней.

Цель данной работы заключалась в рассмотрении состояния мер биобезопасности в свиноводстве и необходимости их усиления в современных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в форме аналитического обзора статистических данных по эпизоотической обстановке африканской чумы свиней (АЧС) на территории РФ, сведений, предоставляемых Россельхознадзором и ветеринарными службами субъектов Российской Федерации, а также собственных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свиньи на земном шаре по численности занимают третье место, уступая крупному рогатому скоту и овцам. Перспективы развития свиноводства довольно благоприятны [2]. Современное состояние свиноводства в мире характеризуется ростом поголовья свиней в различных странах. Основными производителями свинины являются Китай (более половины производимой в мире свинины), США, Бразилия, Германия. В Европе лидером по производству свинины является Германия. В Голландии семейные фермы держат по 200–600 свиноматок. Раньше народившихся здесь поросят откармливали, но из-за проблем утилизации производственных отходов отказались от откорма и сейчас выращивают поросят на экспорт. Следующая по производству свинины — Дания, являющаяся лидером по экспорту продукции (3/4 продукции идет на экспорт), которая продает ремонтных свинок и поросят, в том числе большое количество в Польшу. В Великобритании содержится большая популяция свиней, выращиваемых на семейных фермах. Селекционная работа в стране ведется в корпоративных племенных хозяйствах. Испания также является крупным производителем свинины и имеет большое количество свиноферм. В Италии свиноводческие предприятия, расположенные на севере страны, содержат около 26 тыс. свиноматок. В Хорватии численность общего поголовья свиноматок составляет около 40 тыс.

В России свиноводству уделяется повышенное внимание. Производство свинины в России иностранными экспертами оценивается неоднозначно. Отмечают рост поголовья, но есть вопросы по его устойчивости,



Рис. 1. Рост продукции промышленного свиноводства в РФ (по данным Ю.И. Ковалева, 2015 г.)

критикуют гигантизм предприятий. Когда он выше какого-то уровня, то это связано с рисками, поэтому нужен оптимум. В то же время Ю.И. Ковалев (генеральный директор Национального союза свиноводов) [5] считает, что в России у промышленного свиноводства имеются большие перспективы, и они реализуются (рис. 1).

Системы содержания свиней в мире различны: от хозяйств со свободным выгулом, безвыгульным содержанием до ферм различной мощности и промышленные комплексы. Именно промышленное производство свинины позволит обеспечить население России высококачественным белком животного происхождения (рис. 2).

Рис. 2. Прогнозируемое производство свинины в РФ к 2020 г. (по данным Ю.И. Ковалева, 2015 г.)





Рис 3. Эпизоотическая ситуация по АЧС в РФ в 2015 г. (по данным ФГБУ «Центр ветеринарии» и ГНУ «ВНИИВВиМ»)

По законам многих стран, в том числе в соответствии с законом РФ «О ветеринарии» [4], обеспечение благополучия здоровья животных возлагается на владельцев ферм. Свиньи являются восприимчивыми к большому числу инфекционных патогенов, которые влияют на их здоровье, продуктивность и в конечном счете на рентабельность производства свинины. Подтверждением этому являются вспышки респираторно-репродуктивного синдрома свиней, эндемической диареи, гриппа, классической и африканской чумы свиней.

Распространение АЧС в XXI в., после ее возникновения в Грузии (2007), в другие страны, в том числе в Россию, Украину, Беларусь, Литву, Польшу, Латвию, Эстонию, коренным образом изменило эпизоотический статус государств. АЧС стала проблемой №1 в свиноводстве.

АЧС — контагиозное, остро протекающее вирусное заболевание, поражающее домашних свиней и диких кабанов. Возбудитель АЧС относится ко II генотипу, устойчив к действию факторов окружающей среды, способен длительно сохранять инфекционность в продуктах переработки свинины и пищевых отходах, переносится и распространяется дикими кабанями, а также (при их наличии) клещами рода *Ornithodoros*. Смертность среди инфицированных животных достигает 100% [7, 10]. Методов лечения и специфической профилактики заболевания в настоящее время не существует.

В РФ заболевание свиней АЧС отмечается преимущественно в личных хозяйствах и мелкотоварных фермах, но страдают и крупные свиноводческие предприятия. Основными факторами распространения являются скармливание необезвреженных пищевых отходов, неконтролируемые производственные и торговые связи, нарушение ветеринарно-санитарных правил содержания свиней. Возбудитель АЧС при экспериментальном заражении вызывает заболевание и гибель животных с клинико-анатомическими проявлениями, характерными для острой и подострой форм АЧС (лихорадка, геморрагический диатез, системное поражение лимфоузлов, воспалительно-дистрофические изменения внутренних органов) [1]. Для ликвидации последствий вспышек АЧС поражённое свиноголовье, в соответствии с «Инструкцией о мероприятиях по предупреждению и ликвидации африканской чумы свиней», уничтожают, что обуславливает высокий экономический ущерб, причиняемый заболеванием [4].

В 2015 г. эпизоотическая ситуация по АЧС в РФ оставалась неблагоприятной. В течение года было зарегистрировано 84 вспышки АЧС, в том числе 45 вспышек среди домашних свиней и 39 вспышек среди кабанов (рис. 3).

В условиях риска заноса возбудителя АЧС в популяцию домашних свиней важную роль приобретают вопросы обеспечения биобезопасности свиноводческих хозяйств.



Рис. 4. Меры безопасности в свиноводческих хозяйствах до эпизоотии АЧС

В отсутствие эпизоотии АЧС эта проблема также была актуальной. Однако допускались некоторые «упрощения» и упор делался на соблюдение технологий, гигиену, средства специфической профилактики, лечение и другие виды деятельности (рис. 4, 5).

При изменении эпизоотической обстановки в стране в связи с АЧС, возникновении рисков заноса возбудителя АЧС в свиноводческие хозяйства модели биозащиты ферм потребовали коррекции. Основными рисками заноса возбудителя АЧС на ферму (комплекс) считаются: введение зараженных свиней, контаминированных кормов, воды, инфицированный генетический материал, контаминированный транспорт, оборудование, инвентарь и т.д., перенос возбудителя работниками ферм, специалистами и т.д.

Критерии оценки мер биобезопасности ферм определяются международными и государственными требованиями [6]. На наш взгляд, они должны повышаться с учетом складывающейся эпизоотической обстановки по АЧС. Следует обращать внимание на:

1. Проектную документацию на ферму, ее соответствие требованиям стандартов, соответствие размещения различных помещений ветеринарно-санитарным требованиям.
2. Наличие санитарно-защитной зоны от ближайшего жилого района и лесного массива.
3. Наличие, целостность ограждения по периметру, видеонаблюдение.
4. Дезинфекционные барьеры с навесом на всех въездах (в холодных регионах с подогревом).
5. Перевалочные пункты.
6. Систему охраны фермы.
7. Систему допуска персонала и посетителей на территорию и в производственные зоны фермы.
8. Внутрихозяйственные дороги, схемы их пересечения.
9. Соблюдение карантинных мероприятий, технологии производства, ветеринарного обслуживания, государственного ветеринарного контроля и ведение учетной документации.
10. Хозяйственные связи.
11. Работу с персоналом, его обучение.
12. Санитарно-гигиеническую деятельность, дезинфекцию, дезинсекцию, дезакаризацию, борьбу с грызунами, отпугивание птиц.
13. Требования к безопасности кормов и воды.
14. Транспорт.

15. Утилизацию навоза и стоков.
16. Утилизацию биологических отходов.
17. Плановые противозооотические мероприятия и другие мероприятия, позволяющие обеспечить работу предприятия в режиме закрытого типа.

В ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2010 г. разработаны «Методические рекомендации по оценке биобезопасности свиноводческих предприятий в РФ», а в 2014 г. Россельхознадзор утвердил «Методические указания по оценке биобезопасности свиноводческих предприятий в Российской Федерации» [8]. Биобезопасность некоторых свиноводческих хозяйств периода 2006–2008 гг. была ниже критичной. Важно помнить, что биобезопасность свиноводческого предприятия в целом оценивается по состоянию ее «слабого звена», а при АЧС нет «слабых звеньев» — все звенья важны!

При оценке биологической безопасности свиноферм можно использовать простой алгоритм действий (рис. 6):

Оценку биобезопасности хозяйства необходимо проводить регулярно, т.е. должна быть организована система мониторинга. Надо постоянно учить персонал, что основным сдерживающим фактором возникновения АЧС на объекте является его биологическая защищенность.

Как показывает опыт борьбы с АЧС в современных условиях панзоотии этой болезни, важную роль играет наличие утвержденных нормативных документов по профилактике болезни и общехозяйственной деятельности. Они требуют постоянной актуализации. В целях гармонизации правовых актов РФ с международными стандартами были разработаны «Правила определения зоосанитарного статуса свиноводческих хозяйств, а также организаций, осуществляющих убой свиней, переработку и хранение продукции свиноводства» [10]. Определение зоосанитарного статуса свиноводческих хозяйств (компартментализация) производится на основе анализа рисков заноса возбудителей заразных болезней животных, в том числе и АЧС, по заявлению владельца фермы.

Для усиления работы по борьбе с АЧС, снижения угрозы распространения и ликвидации эпизоотии, снижения риска заноса вируса АЧС в крупные специализированные свиноводческие предприятия III и IV компартиментов необходимо внести поправки в «Закон о личных подсобных хозяйствах» в части усиления уче-

Рис. 5. Точки ветеринарно-санитарного контроля до эпизоотии АЧС (agrolab-nsk.ru)





Рис. 6. Алгоритм действий при оценке биологической безопасности свиноводческого хозяйства

та и контроля содержания свиней в ЛПХ; решить вопросы по управлению популяцией кабана в условиях эпизоотии АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложения по биобезопасности свиноводческих хозяйств сформированы на основе научных знаний о возбудителях инфекционных болезней, их сохранности в окружающей среде, путях передачи и т.д. Как показывает практика ведения свиноводства, соблюдение ветеринарно-санитарных требований в полном объеме позволяет до минимума снизить риски заноса возбудителей АЧС и других инфекционных болезней. Работа хозяйств по принципу «закрытого предприятия» является основой эпизоотического благополучия. Рекомендуемые нормы и правила биобезопасности на свиноводческих фермах (комплексах), постоянный мониторинг состояния биобезопасности — это эффективные меры в арсенале борьбы с экономически значимыми инфекционными болезнями свиней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Африканская чума свиней в России: распространение и клинико-анатомическое проявление / К.Н. Груздев, А.С. Иголкин, А.М. Рахманов, А.А. Шевцов // Ветеринария сегодня. — 2014. — №4 (11). — С. 10–17.
2. Данкверт С.А., Холманов А.М., Осадчая О.Ю. Свиноводство стран мира в конце XX века. — М., 2004. — 142 с.
3. Закон о ветеринарии: Закон РФ № 4979-1 от 14.05.1993: в редакции от 13.07.2015. — М.: КонсультантПлюс, 2015. — 22 с.

4. Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации африканской чумы свиней: утв. Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 21.11.1980. — М., 1980. — 12 с.

5. Ковалев Ю.И. Перспектива развития российского свиноводства в 2015–2020 гг. // Материалы V Международного ветеринарного конгресса. — М., 2015. — 1 CD-ROM.

6. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 1. Общие положения / МЭБ. — 24-е изд. — Paris, France, 2015. — 449 с.

7. Макаров В.В. Африканская чума свиней. — М.: РУДН, 2011. — 268 с.

8. Методические указания по оценке биобезопасности свиноводческих предприятий в Российской Федерации / М.А. Титов, А.К. Караулов, А.А. Шевцов [и др.] // Методические указания по оценке эпизоотической ситуации, превенции и нотификации инфекционных заболеваний животных / ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2015. — С. 127–162.

9. Об утверждении правил определения зоосанитарного статуса свиноводческих хозяйств, а также организаций, осуществляющих убой свиней, переработку и хранение продукции свиноводства: приказ № 258 от 23.07.2010 г. МСХ РФ // Вопр. норм.-прав. регулирования в ветеринарии. — 2010. — № 3. — С. 15–20.

10. Сравнительный анализ свойств изолятов вируса африканской чумы свиней / А.А. Варенцова, С.Г. Ремыга, В.Л. Гаврилова [и др.] // Ветеринария. — 2013. — № 12. — С. 27–32.

УДК 619:616.98:579.843.94

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *HAEMOPHILUS PARASUIS* С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

В.И. Павелко¹, Ю.Ю. Бабин², А.В. Пискунов³, А.В. Спрыгин⁴, О.В. Прунтова⁵

¹ младший научный сотрудник, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pavelko@arriah.ru

² младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: babin@arriah.ru

³ младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: piskunov@arriah.ru

⁴ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁵ руководитель Испытательного центра, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты использования метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для быстрой идентификации полевых изолятов *Haemophilus parasuis*. С помощью программы ClinProTools были выделены 15 пиков в белковом спектре со 100% распознавательной способностью, дифференцирующие 6 представителей *Pasteurellaceae*. Уникальным для *Haemophilus parasuis* является пик массой 8407,92 Да ($p < 0,05$). Дополненная база данных успешно использована для идентификации 8 изолятов *Haemophilus parasuis*. При проверке специфичности метода с 9 видами бактерий семейства *Pasteurellaceae* ложноположительные результаты отсутствовали.

Ключевые слова: гемофильный полисерозит, болезнь Глессера, MALDI-TOF MS, *Haemophilus parasuis*.

UDC 619:616.98:579.843.94

IDENTIFICATION OF *HAEMOPHILUS PARASUIS* USING MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

V.I. Pavelko¹, Yu.Yu. Babin², A.V. Piskunov³, A.V. Sprygin⁴, O.V. Pruntova⁵

¹ Junior Researcher, PhD Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pavelko@arriah.ru

² Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: babin@arriah.ru

³ Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: piskunov@arriah.ru

⁴ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁵ Head of the Testing Centre, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pruntova@arriah.ru

SUMMARY

The paper covers results of MALDI-TOF mass spectrometry used to rapidly identify *Haemophilus parasuis* field isolates. ClinPro Tools software showed 15 peaks in the protein spectrum with 100% identification capability differentiating 6 *Pasteurellaceae* species. Peak corresponding to mass of 8407.92 Da ($p < 0.05$) is unique for *Haemophilus parasuis*. The updated database was successfully used for identification of 8 *Haemophilus parasuis* isolates. No false-positive results were obtained when the method specificity was tested using 9 bacterial species of *Pasteurellaceae* family.

Key words: hemophilic polyserositis, Glässers Disease, MALDI-TOF MS, *Haemophilus parasuis*.

ВВЕДЕНИЕ

Гемофильный полисерозит, или болезнь Глессера, — инфекционное заболевание свиней, характеризующееся серозно-фибринозным перикардитом, плевритом, перитонитом, артритом и менингоэнцефалитом [5].

Возбудителем болезни Глессера является грамотрицательная палочковидная бактерия *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) из семейства *Pasteurellaceae*. Кроме нее респираторной тракт свиней может быть колонизирован такими бактериями, как *Actinobacillus minor* (*A. minor*), *Actinobacillus indolicus* (*A. indolicus*), *Actinobacillus porcinus* (*A. porcinus*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*). При бактериологическом исследовании эти виды можно дифференцировать по биохимическим признакам [6], но это требует наличия дорогостоящих бактериальных сред сложного состава и временных затрат [4]. В последнее время MALDI-TOF масс-спектрометрию (MALDI-TOF MS) часто используют в качестве экспресс-метода идентификации бактерий. Данный метод представляет универсальную, высокочувствительную, быструю и де-

шевую альтернативу генетическим и фенотипическим методам идентификации.

Первые исследования с применением MALDI-TOF MS для идентификации бактерий семейства *Pasteurellaceae* продемонстрировали родовую и видовую специфичность. Однако между близкородственными видами и подвидами идентификация была затруднена [1].

Целью данной работы было дополнение базы данных спектрами *H. parasuis* и *A. minor* для расширения возможностей идентификации бактерий семейства *Pasteurellaceae* от близкородственных микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и изоляты. В работе использовали культуры бактерий 23 штаммов семейства *Pasteurellaceae*, которые представлены в табл. 1.

Все культуры выращивали на колумбийском агаре с добавлением 10% экстракта крови лошади, 10% сывотки КРС и 10% дрожжевого экстракта в течение 24 ч при 37°C.

Таблица 1
Идентификация штаммов и изолятов представителей семейства *Pasteurellaceae*

Название штамма	Lq идентификации	Идентифицированный микроорганизм
* <i>A. minor</i> изолят Магнитный+	2,193	<i>A. minor</i> изолят Магнитный
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27088	2,262	<i>A. pleuropneumoniae</i> DSM 1372T DSM
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27089	2,248	<i>A. pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 33377	2,284	<i>A. pleuropneumoniae</i> 351 LAL
* <i>A. paragallinarum</i> изолят Чамзинское	1,985	<i>A. paragallinarum</i> изолят Чамзинское
* <i>H. parasuis</i> ATCC 19417	2,436	<i>H. parasuis</i> ATCC 19417
* <i>H. parasuis</i> ВГНКИ SK1	2,836	<i>H. parasuis</i> ВГНКИ SK1
* <i>H. parasuis</i> ВГНКИ UR	2,822	<i>H. parasuis</i> ВГНКИ UR
* <i>H. parasuis</i> ВГНКИ IL1	2,670	<i>H. parasuis</i> ВГНКИ IL1
* <i>H. parasuis</i> ВГНКИ IN1	2,624	<i>H. parasuis</i> ВГНКИ IN1
<i>H. parasuis</i> BOT2	2,417	<i>H. parasuis</i> IN1
<i>H. parasuis</i> BOT5	2,517	<i>H. parasuis</i> SK1
<i>H. parasuis</i> KM1	2,417	<i>H. parasuis</i> IN1
<i>H. parasuis</i> KR1	2,294	<i>H. parasuis</i> SK1
<i>H. parasuis</i> N2	2,583	<i>H. parasuis</i> UR
<i>H. parasuis</i> NAG	2,449	<i>H. parasuis</i> SK1
<i>H. parasuis</i> SW124	2,437	<i>H. parasuis</i> UR
<i>H. parasuis</i> VN	2,496	<i>H. parasuis</i> ATCC 19417
<i>H. somni</i> изолят Колос	2,150	<i>H. somni</i> 512 LAL
<i>M. haemolytica</i> ATCC 29696	2,313	<i>M. haemolytica</i> DSM 5283 DSM
<i>P. multocida</i> 115	2,512	<i>P. multocida</i> FI FLR
<i>P. multocida</i> ATCC 15742	2,453	<i>P. multocida</i> FI FLR
<i>P. multocida</i> TS-8	2,418	<i>P. multocida</i> spp. <i>multocida</i> DSM 16031T DSM

* штаммы бактерий, которые использовали для создания профиля спектра и расширения базы данных.

Пробоподготовка. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с методикой, описанной А. Calderaro в 2014 г. [2].

MALDI-TOF MS анализ. Получение и анализ спектров проводились на масс-спектрометре Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия) с помощью программы MALDI Biotyper (версия 3.0) с базой спектров (версия 3.1.2.0; 4111 спектров, Bruker Daltonics, Германия) с параметрами по умолчанию (линейный положительный режим; частота лазера 60 Гц; напряжение источника ионов №1 20 кВ; напряжение источника ионов №2 16,7 кВ; напряжение линзы 7,0 кВ; диапазон масс от 2000 до 20000 Да).

Белковую экстракцию наносили на 3 лунки. Для каждой лунки создавали 15 спектров. Одиночные спектры суммировали из 20 выстрелов лазера. Прибор калибровали с помощью белкового стандарта с точно известными массами белков Bacterial Test standard (BTS) (Bruker Daltonics, Германия) согласно инструкции производителя.

Идентификация. При помощи программы Biotyper сравнивали каждый из полученных спектров с профилями спектров базы данных по наличию и интенсивности пиков. При этом вычислялся показатель сходства, выражающийся логарифмическим коэффициентом от 0 до 3. Производителем установлены три порога: score < 1,7 — микроорганизм не идентифицирован, 1,7 ≤ score ≤ 2,0 — идентификация до рода, score ≥ 2,0 — вид микроорганизма достоверно идентифицирован.

База спектров MALDI-TOF MS для идентификации *H. parasuis*. Для автоматического создания профиля спектра (Main Spectrum Profile, MSP) в программе Biotyper software с помощью Biotyper MSP Creation Standard Method использовали 20 спектров интенсивностью более 10⁴ у.е.

Статистический анализ. Спектры, использованные ранее для создания MSP, импортировали в программу ClinProTools версия 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) для статистического анализа. Программу использовали для визуального сравнения спектров и для идентификации пиков, специфично дифференцирующих *H. parasuis*.

Анализ проводили в диапазоне от 2000 до 20000 Да. Все спектры, загруженные в программу, рекалибровали в автоматическом режиме. Затем проводили анализ данных с помощью метода главных компонент и по результатам анализа строили трехмерный график.

Кроме того, на основе спектров построили классифицирующие модели с помощью 3 статистических алгоритмов: Quick Classifier (QC), Supervised Neural Network (SNN) и Genetic Algorithm (GA). Алгоритмы выделили дифференцирующие пики для каждого микроорганизма. Классификации, полученные с помощью 3 моделей, сравнили друг с другом по значениям параметров «распознавательная способность» («Recognition Capability», RC) и «перекрестная проверка» («Cross Validation», CV). Модель с наивысшим значением параметров RC и CV выбрали для поиска дифференцирующих пиков, представленных в статье. Наличие или отсутствие каждого пика проверили при сравнении 5 усредненных спектров, созданных из 20 одиночных спектров штаммов.

Построение дендрограмм. Кластерный анализ выполняли с помощью построения дендрограмм на основе MSP, используя соответствующую функцию в статистическом пакете Matlab 7.1 (MathWorks Inc.), встроенную в программу MALDI Biotyper. Использовали параметры «Distance Measure Euclidian» и «Linkage complete». Значения нормализовали по шкале от 0 (полное совпадение) до 1000 (отсутствие совпадений).

В построении дендрограммы использовали как MSP, полученные в ходе данной работы, так и присутствующие в базе данных Bruker Biotyper.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью дополнения базы данных спектрами бактерий семейства *Pasteurellaceae* использовали суточные культуры 5 штаммов *H. parasuis* (ATCC 19417, IN1, SK, IL1 и UR).

Для формирования профиля спектра в базе данных с помощью автоматической функции в программе Biotyper использовали 20 спектров (рис. 1). Шесть полученных MSP объединили с оригинальной базой данных для дальнейшей «слепой» идентификации близкородственных бактерий семейства *Pasteurellaceae*.

При проверке специфичности методики с применением изолятов *H. parasuis* VN, KM1, BOT2, KR1, NAG, SW124, LUB и N2 не зафиксировано ложноотрицательных результатов.

Дополнительно, для исключения ложноположительных результатов, метод MALDI-TOF тестировали на специфичность с близкородственными бактериями семейства *Pasteurellaceae*. Для достижения поставленной задачи использовали суточные культуры *A. pleuropneumoniae* ATCC 27088, *A. pleuropneumoniae* ATCC 27089, *A. pleuropneumoniae* ATCC 33377, *H. somni* изолят Колос, *M. haemolytica* ATCC 29696, *P. multocida* 115, *P. multocida* ATCC 15742, *P. multocida* TS-8. Результаты оценки специфичности разработанной методики представлены в табл. 1. По результатам исследования не выявлено ложноположительных результатов.

Для визуализации и идентификации дифференцирующих пиков бактерии рода *Haemophilus* и близкородственных представителей рода *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Avibacterium* и *Histophilus* импортировали в программу

Рис. 1. Трехмерный график спектров штаммов *H. parasuis*, построенный с помощью метода главных компонент
зеленый — *A. minor* изолят Магнитный; желтый — *A. pleuropneumoniae* ATCC 27088; красный — *A. paragallinarum* Чамзинское; синий — *H. somni* Колос; голубой — *H. parasuis* ATCC 19417; розовый — *H. parasuis* IL1; розовый — *H. parasuis* IN1; розовый — *H. parasuis* SK; розовый — *H. parasuis* UR; красный — *P. multocida* 115.

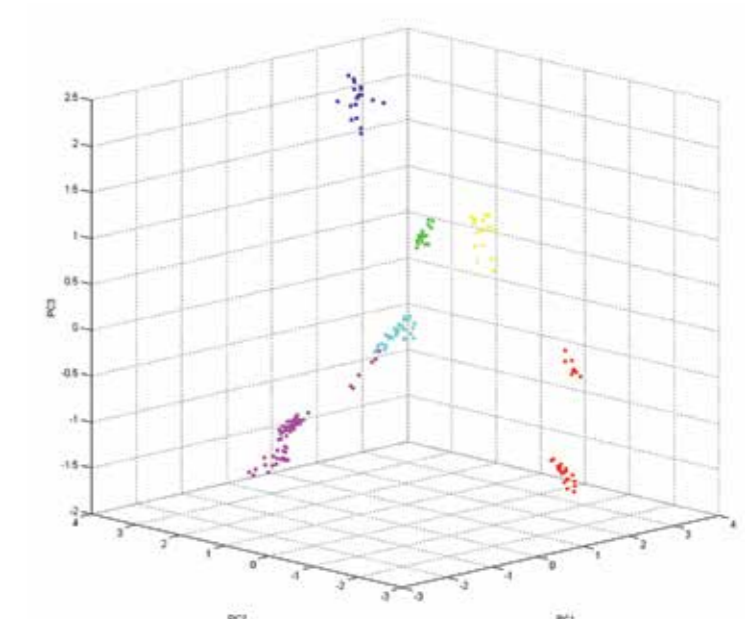


Таблица 2
Дифференцирующие пики модели SNN

№ п/п	Соотношение масса/заряд белкового пика	<i>A. minor</i>	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. paragallinarum</i>	<i>H. somni</i>	<i>H. parasuis</i>	<i>P. multocida</i>
1	2562,52	-	-	-	+	-	-
2	3478,49	-	-	+	-	-	-
3	3600,84	+	-	-	-	-	-
4	3844,7	-	-	-	-	-	+
5	4187,6	+	-	-	+	-	+
6	4266,02	-	+	-	-	-	-
7	4595,82	-	-	+	-	-	-
8	4666,73	-	-	+	-	-	-
9	6304,33	+	+	-	-	-	+
10	7149,08	-	-	-	-	+	+
11	7201,39	+	-	-	-	-	-
12	8407,92	-	-	-	-	+	-
13	9189,56	-	-	+	-	-	-
14	12803,31	+	-	-	-	-	-
15	19476,08	-	-	-	+	-	-

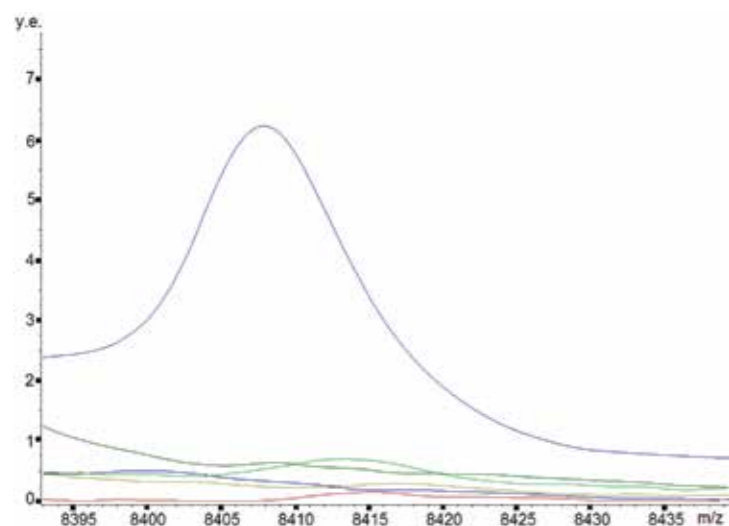
ClinProTools. Для определения гомогенности белковых спектров использовали метод главных компонент. Метод позволяет сократить размерность данных и определить уникальные переменные. На трехмерном графике спектры образуют 6 кластеров. Бактерии вида *H. parasuis* распределяются на 2 группы: в первую груп-

пу вошли спектры штаммов ATCC 19417, IL1 (розовый и голубой цвет), вторая группа состояла из штаммов IN1, SK, UR. *P. multocida* 115 и *A. paragallinarum* Чамзинское вошли в третий кластер (красный цвет). Остальные спектры бактерии вида *A. minor*, *A. pleuropneumoniae*, *H. somni* были отнесены в отдельные кластеры (рис. 1).

Для определения дифференцирующих пиков использовали классифицирующие модели. Для этого использовали 3 алгоритма: Quick Classifier (QC), нейронную сеть, обучающуюся с учителем (Supervised Neural Network, SNN), и генетический алгоритм (Genetic Algorithm, GA). Модели на основе предоставляемых выборочных данных способны классифицировать результаты для новых случаев. QC-модель имела самые низкие значения RC=96,98% и CV=95,95%. Лучший результат со 100% возможностью распознавания и 100% уровнем кросс-валидации продемонстрировала SNN-модель. Модель на основе GA показала чуть более низкое значение CV=99,9%. SNN-модель была основана на 10 областях, представленных в табл. 2, в белковом спектре со 100% специфичностью дифференцирующих *H. parasuis*, *P. multocida*, *A. paragallinarum*, *A. minor*, *A. pleuropneumoniae* и *H. somni*. Классифицирующие алгоритмы широко применяются в масс-спектрометрии для поиска биомаркеров представителей одного рода [2] и для дифференциации патогенных и непатогенных штаммов одного вида [3].

Наличие пиков проверили визуально у одиночных спектров всех 6 бактерий. Пример пика массой 8407,92 Да, дифференцирующего *H. parasuis*, представлен на рис. 2.

Рис. 2. Пример дифференцирующего пика массой 8407,92 Да фиолетовый — *H. parasuis*; красный — *A. minor*; синий — *A. paragallinarum*; светло-зеленый — *A. pleuropneumoniae*; желтый — *H. somni*; темно-зеленый — *P. multocida*.



Способность метода определять клональность изолятов используют для быстрого субтипирования [3]. По сравнению с биохимическими и генетическими методами, такими как секвенирование и типирование на основе мультилокусного секвенирования, дифференциация бактерий с помощью MALDI-TOF MS быстрее, дешевле и менее трудозатратна.

Для изучения протеомических свойств построили дендрограмму, демонстрирующую внутривидовые сходства и отличия штаммов и изолятов *H. parasuis*. Как видно на рис. 3, все 14 представителей *H. parasuis* принадлежат к одной кладе. Наиболее близким «соседом» к группе *H. parasuis* является изолят *A. minor*. Протеомические профили бактерий рода *Actinobacillus*, *Haemophilus* и *Pasteurella*, в том числе представленные в базе данных, образуют смешанные клады, как и полногеномные последовательности [7]. Представители *A. paragallinarum*, *H. somni*, *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, использованные для поиска дифференцирующих пиков, входят в кластеры, образованные другими представителями соответствующих родов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была дополнена база данных белковых спектров Bruker Biotyper профилями спектров 5 штаммов *H. parasuis*, 1 изолята *A. minor* и изолята *A. paragallinarum*.

При построении классифицирующих моделей наилучший результат показала модель на основе алгоритма SNN. Распознавательная способность модели составила 100%, коэффициент перекрестной проверки 100%. Согласно этой модели, характерным для *H. parasuis* является пик массой 8407,92 Да (p<0,05).

В данной работе впервые были представлены дифференцирующие пики для 6 близкородственных представителей семейства *Pasteurellaceae*. Проверка специфичности дополненной базы данных показала отсутствие ложноположительных результатов.

Метод позволяет идентифицировать *H. parasuis* от близкородственных микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae*.

Авторы выражают благодарность И.В. Подколзину за консультативную помощь, Н.Б. Щадровой за техническую помощь и А.В. Потехину за предоставленные изоляты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry / P. Kuhnert [et al.] // J. Microbiol. Methods. — 2012. — Vol. 89, № 1. — P. 1–7.
2. Identification of *Borrelia* species after creation of an in-house MALDI-TOF MS database / A. Calderaro [et al.] // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9, № 2:e88895. — doi: 10.1371/journal.pone.0088895.
3. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry:

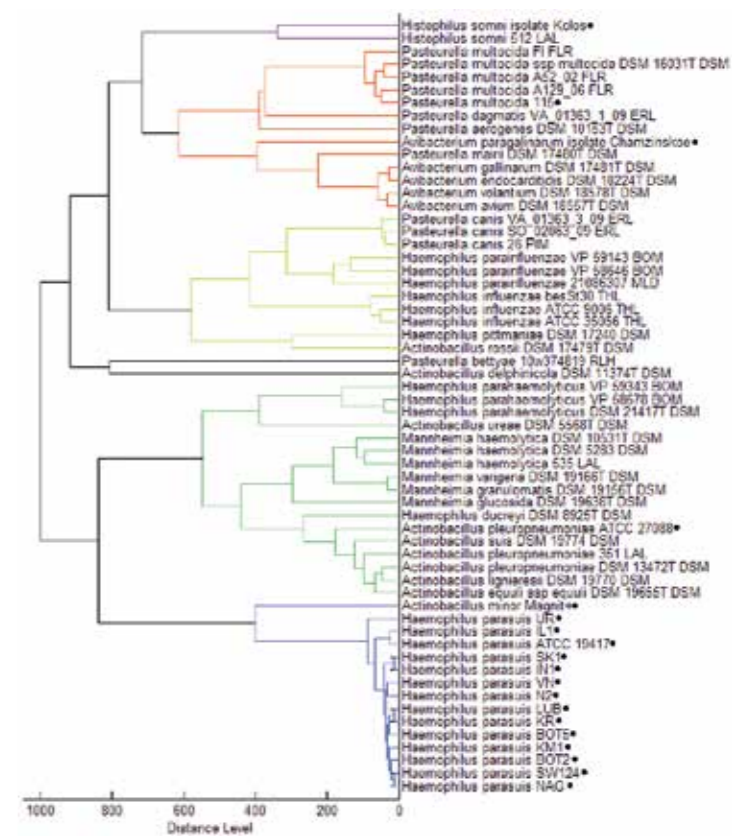


Рис. 3. Дендрограмма на основе MSP *H. parasuis* и близкородственных бактерий

• спектры бактерий, полученные в ходе данной работы.

do we need guidance for data interpretation? / S. Spinali [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2015. — Vol. 53, № 3. — P. 760–765.

4. Olvera A., Segalés J., Aragon V. Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods // Vet. J. — 2007. — Vol. 174, № 3. — P. 522–529.

5. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method / H. Amano, M. Shibata, N. Kajio, T. Morozumi // J. Vet. Med. Sci. — 1994. — Vol. 56, № 4. — P. 639–644.

6. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance / P. Kielstein [et al.] // Vet. Microbiol. — 2001. — Vol. 81, № 3. — P. 243–255.

7. Phylogenomic and molecular demarcation of the core members of the polyphyletic *Pasteurellaceae* genera *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella* / S. Naushad [et al.] // Int. J. Genomics. — 2015. — Vol. 2015. — URL: http://dx.doi.org/10.1155/2015/198560.

КОРОНАВИРУСНЫЕ ЗООНОЗЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РУКОКРЫЛЫМИ

В.В. Макаров¹, Д.А. Лозовой²

¹ доктор биологических наук, профессор, Российский университет дружбы народов, г. Москва, e-mail: vvm-39@mail.ru

² директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье рассматриваются естественно-исторические аспекты эмерджентности особо опасных коронавирусных инфекций, резервуаром для которых являются рукокрылые, — тяжелого острого респираторного синдрома («атипичной пневмонии») и ближневосточного респираторного синдрома, — их происхождение и распространение.

Ключевые слова: *Chiroptera*, вирусы рукокрылых, природная очаговость, тяжелый острый респираторный синдром, ближневосточный респираторный синдром.

CORONAVIRUS ZOOZOSES ASSOCIATED WITH CHIROPTERA

V.V. Makarov¹, D.A. Lozovoy²

¹ Doctor of science (Biology), professor, RUDN University, Moscow, e-mail: vvm-39@mail.ru

² Director, Candidate of Science (Veterinary medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lozovoy@arriah.ru

SUMMARY

The paper considers natural historical aspects of emerging highly dangerous coronavirus infections found in a Chiroptera reservoir, of serious acute respiratory syndrome ("atypical pneumonia") and Middle East respiratory syndrome, their origin and spread.

Key words: *Chiroptera*, *Chiroptera* viruses, endemicity, serious acute respiratory syndrome, the Middle East respiratory syndrome.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в возникновении эмерджентных инфекций вирусной этиологии особая роль принадлежит рукокрылым — наименее изученной во всех отношениях таксономической группе животных, их биоэкологии, патологии, резервуарной роли и т.п. Представители отряда *Chiroptera*, с учетом многочисленности, продолжительности жизни и ряда уникальных биоэкологических обстоятельств их воздушно-наземного существования, предполагаются в качестве

приоритетной угрозы для здоровья домашних животных и человека как криптогенный источник новых эпизоотий и эпидемий.

Более 15 семейств вирусов выделено от рукокрылых 200 видов 12 семейств. С рукокрылыми ассоциированы около 70 документально идентифицированных вирусов, в пересчете на один биологический вид больше, чем у самого многочисленного отряда грызунов. Каждый год идентифицируются новые патогены, выделенные от летучих мышей [3, 6]. Именно рукокрылые оказываются резервуарами и источниками паразитического бешенства летучих мышей в Америке и Европе, таких опасных, ранее неизвестных науке зоонозов, как тяжелый острый респираторный синдром в Юго-Восточной Азии (2002–2003 гг.) и ближневосточный респираторный синдром (с 2012 г.), вызываемые коронавирусами, хенипавирусные болезни Хендра и Нипах (1990-е гг.), чрезвычайно злокачественные, фатальные геморрагические филовирусные лихорадки Марбург и Эбола [4, 6, 14].

ТЯЖЕЛЫЙ ОСТРЫЙ РЕСПИРАТОРНЫЙ СИНДРОМ

Эта новая, неизвестная ранее науке эмерджентная инфекция человека (ТОРС, Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS), получившая в СМИ название «атипичная пневмония» и вызвавшая серьезную тревогу мировой общественности, впервые зарегистрирована в ноябре 2002 г. в китайской провинции Гуандонг, которая оставалась наиболее пораженной зоной в течение всего неблагоприятного периода. Возбудитель был идентифицирован как новый, неизвестный ранее ТОРС-коронавирус (ТОРС-КоВ, SARS-CoV). Болезнь клинически сопровождалась высокой лихорадкой, общим дискомфортом, головной и мышечной болями, сухим кашлем, во многих случаях пневмонией, с передачей инфекции по цепи от больного к восприимчивому тривиальным воздушно-капельным путем. Власти Китая сообщили о 1153 случаях нового заболевания и 40 летальных исходах (3,5%). Подробная суммированная сводка по хронологии заболеваемости, симптоматологии и другим первичным характеристикам ТОРС'а на ранних этапах развития ситуации приведена в публикации Синопальникова А.И. и соавт. [2].

К апрелю 2003 г. было зарегистрировано уже около 2300 заболевших и 79 погибших (те же 3,5%) в 16 странах мира. Новые случаи в течение ближайших месяцев продолжали регистрироваться в Канаде, Гонконге, Тайване, Китае, Франции, Сингапуре, США, Вьетнаме, первые случаи — в Бразилии, Румынии, Ирландии, Кувейте. В среднем ежедневная инцидентность составляла 100 новых случаев ТОРС'а. Статистическая экстраполяция указывала на очень неблагоприятные тренды (рис. 1) [22, 24].

Эпидемиологические исследования показали, что первичные случаи ТОРС'а были связаны с охотничьим промыслом. Анализ дичи, проведенный на рынках, выявил ТОРС-подобные коронавирусы у гималайских циветт (*Paguma larvata*) и енотовидных собак (*Nyctereutes procyonoides*), а также серопозитивность свиней барсуков (*Arctonyx collaris*) [24].

Важно, что эпидемиология этих диких животных, чье мясо поступало в продажу и далее в потребительские пищевые цепи, соответствовала критериям факторной этиологии инфекций. Никаких признаков, связанных с коронавирусами, у животных при этом не было обнаружено, хотя впоследствии циветты, экспериментально зараженные ТОРС-КоВ от человека, оказались высоковосприимчивы. При факторной патологии для обострения скрытой инфекции и манифестации условно-патогенной микрофлоры требуются стрессовые воздействия на макроорганизм, главным образом всякого рода принуждения, перемещения и скученность, угнетающие защитные реакции. Именно вследствие этого развивается симптоматика, экскреция инфекционных агентов и заражение по эпидемическим цепям. Поэтому подвергавшиеся стрессовым воздействиям животные, у которых были обнаружены маркеры инфекции (ПЦР- или серопозитивность), являлись источниками вируса [8, 16].

Дальнейшие обширные вирусологические обследования домашних, диких животных и птиц на юге Китая для выявления возможного природного резервуара ТОРС-КоВ с помощью ПЦР показали, что гималайские циветты оказались лишь промежуточным звеном, а не основными его источниками. Инфицированность и серопозитивность были установлены у летучих

мышей-подковоносов нескольких видов (семейство *Rhinolophidae*, род *Rhinolophus* spp.); серопревалентность достигала 84%, причем непосредственной связи заболеваний людей с рукокрылыми не установлено [5, 12, 13, 23].

Таким образом, естественная история ТОРС'а включает ранее неизвестный ТОРС-КоВ-подобный вирус летучих мышей, распространившийся на мясных рынках среди увеличившегося числа новых восприимчивых животных, «взявших на себя» роль амплификаторов инфекции, главным образом гималайских циветт (рис. 2), а затем переход на человека при близком контакте с животными-амплификаторами или происходящими от них продуктами. Последующая передача вируса от человека к человеку была связана с адаптивными мутациями в вирусном геноме [5, 11].

Возникновение и стремительное количественное и географическое распространение новой столь опасной болезни оказалось хрестоматийной эмерджентной ситуацией, возникшей по механизму универсального трафика возбудителя зоонозной инфекции из природного резервуара на человека, где определяющими оказались сугубо социальные факторы (в частности, национальные традиции питания). Причиной старта эпидемии в Китае и прилегающем регионе (Гонконге, Тайване) явилось разведение и употребление населением в пищу мяса скрыто инфицированных виверровых — гималайских циветт (*Paguma larvata*), наземных плотоядных, распространенных в этом ареале, которые явились амплификатором в трафике коронавиральной инфекции с высоким зоонотическим потенциалом из ее естественного резервуара — летучих мышей-подковоносов по цепи «летучие мыши-подковоносы рода *Rhinolophus* spp. → гималайские циветты → люди — потребители мяса циветт → ...».

В ходе последующей эмерджентной серии эпидемических вспышек ТОРС'а в 2002–2003 гг. оказались инфицированными и заболели 8465 человек, умерли 813, летальность составила 9,6%. Наиболее напряженная ситуация сложилась в регионе Китая, на который пришлось 92% общей заболеваемости. В эпидемию оказались вовлечены 30 стран мира, в т.ч. Россия (1 случай), Канада (251), США (192), страны Западной Европы (34), что свидетельствовало о высоком эпидемическом потенциале новой инфекции. Быстрая расфигурка эпидемического стереотипа ТОРС'а и принятие жестких мер, прежде всего по предотвращению контактов с источником зоонотической инфекции (запрет употребле-

Рис. 1. Динамика общей инцидентности ТОРС'а в мире в критический период распространения (март–май 2003 г.) [24]

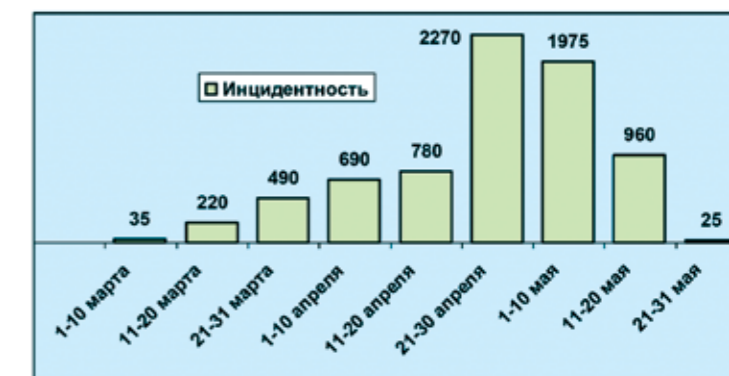




Рис. 2. Гималайские циветты *Paguma larvata* [Internet]

ния в пищу, продажи и импорта виверровых), привели к резкому снижению инцидентности вплоть до sporadических случаев (рис. 1); в 2004 г. зарегистрировано 12 последних инцидентов. Общий ущерб, нанесенный эпидемией ТОРС'а по всем прямым и косвенным статьям расходов, составил сравнительно рекордную сумму в ~50 млрд долл. США [7, 22, 24].

БЛИЖНЕВОСТОЧНЫЙ РЕСПИРАТОРНЫЙ СИНДРОМ

Зоонотическая опасность ТОРС-подобных коронавирусов оказалась гораздо серьезней и не ограничилась данной эпидемией. Через десять лет, с сентября 2012 г., в Саудовской Аравии стали регистрироваться случаи тяжелой острой пневмонии с почечной недостаточностью. Болезнь, по относительной аналогии с ТОРС'ом, получила название в окончательном варианте *ближневосточный респираторный синдром* (БВРС, Middle East respiratory syndrome, MERS, ранее «саудовский ТОРС», Saudi SARS). Был изолирован коронавирус (БВРС-коронавирус, БВРС-КоВ, MERS-CoV), отличающийся от возбудителей простудных заболеваний. Вскоре в Саудовской Аравии, а также в близлежащих Катар и ОАЭ возникло более сотни заболеваний, зарегистрированы «завозные» случаи в Великобритании, Франции, Италии и других странах. Летальность составила 45% [17, 19].

К лету 2015 г. случаи БВРС'а зафиксированы в 25 странах на Ближнем и Среднем Востоке (Иран, Иордания, Кувейт, Ливан, Оман, Катар, Саудовская Аравия, ОАЭ, Йемен), в Европе (Австрия, Франция, Германия, Греция, Италия, Нидерланды, Турция, Великобритания), Азии (Китай, Филиппины, Южная Корея), Америке (США) и др. Зарегистрировано более 1350 подтвержденных случаев заболевания, около 500 смертельных исходов (средняя летальность 36%), и заболеваемость продолжается (импортированный из Омана случай в январе 2016 г. в Таиланде). Основная часть заболеваемости и смертности — на Ближнем Востоке (только в Саудовской Аравии более 1000 случаев, ~80%), в мае–июне 2015 г. возникла серьезная эмерджентная эпидемическая вспышка в Южной Корее (см. ниже) [18].

Клиническая картина новой инфекции во многом аналогична азиатскому ТОРС'у и характерна для тяжелого острого респираторного расстройства: инкубационный период 7–14 дней (в среднем 12 дней), первые симптомы — лихорадка, кашель, одышка, по мере развития болезнь переходит в форму тяжелой вирусной пневмонии, в некоторых случаях сопровождается почечной недостаточностью.

Несмотря на реальное распространения БВРС'а по цепи «человек → человек», риск такой горизонтальной передачи считается крайне низким. Во-первых, БВРС-КоВ относительно малоустойчив вне организма и передается от человека к человеку только при тесном прямом контакте с больным — источником инфекции аэрогенным воздушно-капельным путем (респираторно, ингаляционно). Поэтому большинство инцидентов возникает при наличии таких условий: общение в медицинских учреждениях, в семье, при посещении и уходе за больными. Во-вторых, чувствительными к возбудителю являются только 20% клеток эпителия легких (неворсинчатых), поэтому ингалируемая инфицирующая доза должна содержать достаточно большое его количество, что объективно зависит от целого ряда факторов клинко-патогенетического порядка: продолжительности заразительного периода в течение болезни (экскреции возбудителя), выраженности клинических признаков, прежде всего кашля как механизма выделения и передачи возбудителя, устойчивости последнего в аэрозолированном состоянии.

Эпидемиологические и клинические наблюдения показывают, что БВРС поражает преимущественно людей определенной группы риска. Это лица пожилого возраста (старше 60 лет) и с хронической патологией (диабет, онкологические заболевания, энтеральные, респираторные и иные расстройства и т.п.) — та же факторная группа риска для прочих острых респираторных вирусных инфекций и гриппа [9, 21].

По той же логической аналогии с ТОРС'ом было высказано предположение о связи нового коронавирусного заболевания с природными очагами и теми же рукокрылыми. Сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов нового коронавируса, выделенного от больных БВРС'ом людей, его генетическую аналогию (отличия менее 1,8%) с известными коронавирусами рукокрылых от нетопырей рода *Pipistrellus* spp. — обитателей Аравийского полуострова [15, 19].

При отсутствии реальных эпидемических связей между резервуарами инфекции в природе и вспышкой заболеваемости людей естественным было последующее предположение о необходимости промежуточного амплификатора среди животных, уже имеющих соответствующие контакты с людьми и обеспечивающих такую связь, прежде всего среди весьма ограниченного количества домашних и продуктивных видов, используемых в Ближневосточном регионе (крупный рогатый скот, овцы, козы, различные камелиды). Серологическими обследованиями установлено, что таковым яв-

ляются только местные верблюды, серопозитивность которых достигает 100% [20].

В странах региона, в частности, в Саудовской Аравии и ОАЭ, широко производится и потребляется разнообразная продукция, связанная с эксплуатацией одногорбых верблюдов-дромедаров (*Camelus dromedarius*). Особенно популярно верблюжье мясо, поэтому сравнительно велика их популяция. В природно-климатических условиях Ближнего Востока вполне реальны естественные прямые и не прямые контакты с рукокрылыми. Важное значение в качестве опосредующего фактора передачи инфекции от рукокрылых к другим млекопитающим-амплификаторам могут иметь контаминированные пещерные водоисточники и гуано. В прошлом бесчисленные стада диких дромедаров кочевали по пустыням Северной Африки и Ближнего Востока, однако в настоящее время можно встретить только одомашненных животных. Дикие популяции не сохранились, лишь в Австралии и Северной Америке встречаются вторично одичавшие стада верблюдов — далёких потомков некогда завезённых на континенты дромедаров. В современном мире дромедары распространены во многих регионах Азии и Африки как домашние животные для перевозки грузов, верховой езды, удовлетворения пищевых потребностей (рис. 3).

Таким образом, происхождение и эпидемиологический вектор БВРС'а как очевидно природно-очаговой зоонотической инфекции принципиально сходны с таковыми для ТОРС'а: «резервуары — летучие мыши рода *Pipistrellus* (нетопыри) → амплификаторы — аборигенные верблюды → источник инфекции — мясо верблюдов, очень популярное у населения этих стран, → люди → люди...».

Южная Корея. Эпидемическая ситуация с возникновением и распространением БВРС'а в Южной Корее в мае–июне 2015 г. явилась серьезным и поучительным прецедентом в рамках явления эмерджентности на современном этапе. Общее число инфицированных составило 186 человек, 35 смертельных исходов, летальность 19%. Карантинированию подвергнуты около 2250 человек. О завершении мероприятий по ликвидации эпидемии сообщено только в конце декабря 2015 г.

Занос инфекции в страну представляет классический пример безотносительного к расстоянию межгосударственного трафика возбудителей острых эпидемических заболеваний (аналогично гриппу А и ему подобных острым контагиозным респираторным и кишечным инфекциям). Пожилой житель Южной Кореи, владелец фермы в Саудовской Аравии, после посещения ряда стран неблагоприятного по БВРС'у региона (Бахрейн, Катар, Кувейт, Саудовская Аравия) по прибытии домой во второй половине мая 2015 г. обратился в клинику с жалобами на острый простудный синдром. С этого началось горизонтальное и голомиантное, относительно быстрое по сравнению с примерами других стран распространение инфекции среди контактировавших различным образом людей в пределах одной деревни — местожительства индекс-пациента (указанное выше количество зараженных в течение конца мая – первой половины июня 2015 г.). Распространение болезни за пределы ее и клиник, где содержались инфицированные, удалось предотвратить.

Подобные особенности эпидемиологического паттерна южнокорейской вспышки БВРС'а могли быть обусловлены целым рядом специфических факторов ри-



Рис. 3. Вверху одногорбые верблюды *Camelus dromedarius* (слева и в центре) и двугорбый верблюд *Camelus bactrianus* (справа), внизу ареал распространения *Camelus dromedarius* [Internet]

ска «субъективного», национального характера. К таковым относятся высокая плотность населения, развитый транспорт, активная экономика, общественная свобода и повышенная мобильность населения, множество разнообразных крупномасштабных мероприятий и другие атрибуты высокоразвитого общества, способствующие распространению инфекции. Есть даже своеобразная версия, что и «климат Южной Кореи «как-то особенно подошел» новому коронавирусу» [1].

Кроме того, отмечается ряд профессиональных причин, также послуживших в данной ситуации факторами эпидемиологического риска, которые весьма поучительны для организации надзорных служб в Российской Федерации.

1. Система здравоохранения Южной Кореи не была готова к вероятности заноса БВРС'а как новой, в прямом смысле экзотической инфекции. Об этом заболевании в лучшем случае только слышали, но недостаточно быстро были организованы противоэпидемические надзорные мероприятия, карантин и деконтаминация объектов. Кроме того, в стране с населением 50 млн человек вообще слабо развита эпидемиология и соответствующая служба, недостаточно квалифицированных специалистов, оборудования, опыта, научных центров, работающих в этой сфере.

2. Система здравоохранения в национальном масштабе в целом уязвима в отношении эпидемической угрозы. Пациенты предпочитают так называемый «медицинский шопинг», когда в поисках наилучших условий свободно пользуются услугами многих клиник, разнося инфекционное заболевание. Принято неограниченное посещение больных большим количеством родственников и близких, больные свободны в перемещениях, приемные переполнены, никто не изолирован.

3. На начальном этапе развития ситуации последовала ошибочная реакция органов власти — сокрытие информации об очагах заражения, что помешало своевременно и быстро их локализовать. Клиники, где содержались зараженные БВРС-КоВ пациенты, продол-

жали работать в обычном режиме, не были приняты экстренно необходимые противозидемические меры. Не подлежали контролю больные БВРС'ом и экспорированные к заболеванию, многие из инфицированных продолжали жить обычным образом, игнорируя карантин.

Все это вместе привело к тому, что в мире по количеству зараженных Южная Корея вышла на второе место и уступает только Саудовской Аравии [1, 18].

В качестве определенной аналогии следует привести недавнюю, также эмерджентную, тяжелую эпизоотию ящура в Южной Корее 2011–2012 гг., сопровождающуюся продолжительной кампанией по искоренению заболеваемости восприимчивых сельскохозяйственных животных с чрезвычайными трудностями, экономическими издержками более 5 млрд долл. США, ликвидацией 3,5 млн голов рогатого скота и свиней, как свидетельство отсутствия должной готовности ветеринарной службы страны к серьезной радикальной противозидеотической деятельности [10]. Оппозитным, положительным примером упреждающего внимания к подобным чрезвычайным ситуациям может служить результативная кампания по экстренной ликвидации эмерджентной эпизоотии ящура в Великобритании в 2001 г. с расходами в 30 млрд долл. США, где движущими причинами внутригосударственного распространения инфекции также во многом явились факторы хозяйственно-экономического характера: высокая популяционная плотность и многочисленные перемещения/перевозки продуктивных восприимчивых животных, удаленность и территориальная разобщенность убойно-перерабатывающих предприятий.

Благодарность. Авторы выражают признательность студентам ветеринарного отделения Российского университета дружбы народов Анастасии Чернышевой, Екатерине Пиедра-Соболевской, Анне Лаптевой, Ирине Бондаревой, Ирине Поповой, Ольге Петровой за помощь в сборе и подготовке материалов по теме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ближневосточный респираторный синдром. — URL: <https://ru.wikipedia.org/>.
2. Тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС, SARS) / А.И. Синопальников, А.В. Воробьев, Ю.Г. Белоцерковская, И.В. Андреева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2003. — Т. 5, № 3. — С. 225–242.
3. A comparison of bats and rodents as reservoir of zoonotic viruses: are bats special? / A. Luis, D. Hayman, T. O'Shea [et al.] // Proc. Roy. Soc. B. Biol. Sci. — 2013. — Vol. 280 (1756). — doi:10.1098/rspb.2012.2753.
4. Bat flight and zoonotic viruses / T. O'Shea, P. Cryan, A. Cunningham [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2014. — Vol. 20 (5). — P. 741–745.
5. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses / W. Li, Z. Shi, M. Yu [et al.] // Science. — 2005. — Vol. 310 (5748). — P. 676–679.
6. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses / Ch. Calisher, J.E. Childs, H.E. Field [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. — 2006. — Vol. 19, № 3. — P. 531–545.
7. Brown C. Emerging zoonoses and pathogens of public health significance — an overview // Rev. Sci. Tech. OIE. — 2004. — Vol. 23 (2). — P. 435–442.
8. Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome

coronavirus isolates / D. Wu, C. Tu, C. Xin [et al.] // J. Virol. — 2005. — Vol. 79. — P. 2620–2625.

9. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission / B. Guery, J. Poissy, L. El Mansouf [et al.] // The Lancet. — 2013. — Vol. 381 (9885). — P. 2265–2272.

10. Control of foot and mouth disease during 2010–2011 epidemic South Korea / J. Park, K. Lee, Y. Ko [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2013. — Vol. 19 (4). — P. 655–659.

11. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human / H. Song, C. Tu, G. Zhang [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102. — P. 2430–2435.

12. Dobson A.P. What links bats to emerging infectious diseases? // Science. — 2005. — Vol. 310 (5748). — P. 628–629.

13. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related *Rhinolophus* bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events / S. Lau, K. Li, Y. Huang [et al.] // J. Virol. — 2010. — Vol. 84 (6). — P. 2808–2019.

14. Food and Agriculture Organisation of the United Nations Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests / ed. S. Newman [et al.] // FAO Animal Production and Health Manual. — Rome, 2011. — Vol. 12. — 178 p.

15. Guangwen L., Di L. SARS-like virus in the Middle East: A truly bat-related coronavirus causing human diseases // Protein Cell. — 2012. — Vol. 3 (11). — P. 803–805.

16. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China / Y. Guan, B. Zheng, Y. He [et al.] // Science. — 2003. — Vol. 302 (5643). — P. 276–278.

17. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia / A. Zaki, S. van Boheemen, T. Bestebroer [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2012. — Vol. 367. — P. 1814–1820; doi:10.1056/NEJMoa1211721.

18. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) — Republic of Korea // WHO. — 2015. — URL: <http://www.who.int/csr/don/01-june-2015-mers-korea/en/>.

19. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia / Z. Memish, N. Mishra, K. Olival [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2013. — Vol. 19 (11). — P. 1819–1823.

20. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study / C. Reusken, B. Haagmans, B. Müller [et al.] // The Lancet. — 2013. — Vol. 13 (10). — P. 859–866.

21. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. — URL: <https://en.wikipedia.org/>.

22. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome / T. Kuiken, R. Fouchier, M. Schutten [et al.] // The Lancet. — 2003. — Vol. 362 (9380). — P. 263–270.

23. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats / S. Lau, P. Woo, K. Li [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102. — P. 14040–14045.

24. Summary table of SARS cases by country, 1 November 2002–7 August 2003 // WHO. — URL: http://www.who.int/csr/sars/country/2003_08_15/en/.

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

Журнал «Ветеринария сегодня» приглашает авторов для публикации своих научных работ

Редакция «Ветеринарии сегодня» рассмотрит возможность для публикации Ваших научных статей на страницах журнала. Наша миссия — представление основных направлений развития ветеринарной науки, привлечение внимания мировых научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии, формирование и развитие единого мирового научного знания.

Мы публикуем статьи как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работников ветеринарных учреждений для обмена опытом, обеспечения устойчивого ветеринарного благополучия и для новых научных дискуссий.

Журнал основан в 2012 г. на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» («ВНИИЗЖ»). Статьи публикуются на двух языках: русском и английском. Тематическое содержание журнала меняется в зависимости от текущих задач науки и практики. Журнал распространяется по всей территории России, а также в крупнейших мировых научных центрах.

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки.



Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных, представление результатов теоретических и экспериментальных исследований в данной области.



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 10–12 страниц – но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы). В случае, если у вас нет возможности перевести статью самостоятельно, редакция в индивидуальном порядке готова помочь решить эту проблему.

**Предоставление в редакцию рукописи статей являются подтверждением согласия автора на использование его произведения как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник.*

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. УДК;
2. Название статьи;
3. Имя, отчество, фамилия автора;
4. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты;
5. Резюме (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7–8 строк (300–500 знаков с пробелами);
6. Ключевые слова (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи;

7. Введение;
8. Материалы и методы;
9. Результаты и обсуждения;
10. Выводы и заключение;
11. Список литературы (т.е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): Правила составления ГОСТ Р 7.05-2008. Не более 5–7 источников;
12. Иллюстрированные материалы (фото, картинки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек

на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tif или .jpg (рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно);
13. Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии/руководителя, заверенные круглой печатью учреждения.

**В таком же порядке и с такой же структурой предоставляется англоязычный перевод статьи.*

Работа должна быть предоставлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – одинарный, размер полей по 2 см, отступ в начале абзаца 1 см, форматирование по ширине.

Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники и «вмещаться» в печатное поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

Оригиналы и копии присланных статей не возвращаются. Авторы должны гарантировать, что поданный материал не был ранее опубликован. Важным условием для принятия статей в журнал «Ветеринария сегодня» является выполнение всех вышеперечисленных требований редакции.

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Подписку на журнал «Ветеринария сегодня» можно оформить через каталог «Газеты. Журналы» ОАО Агентство «Роспечать». Подписной индекс издания 70460. Стоимость подписки на полугодие (два выпуска журнала) 1520 руб. 00 коп. Подписаться на журнал можно в любом отделении «Почты России».

БОЛЕЕ ПОДРОБНЫЕ УСЛОВИЯ О ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ:

Адрес: 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец
телефон: +7 (4922) 26-15-12, 26-17-65, 26-19-88
Контактное лицо: Борисова Ольга Анатольевна (тел. добавочный 22-27)

Испытательный центр (ИЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ») был создан и аккредитован Федеральным агентством по техническому регулированию на базе отдела токсикологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» 26 августа 2005 года и является структурным подразделением ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»



ОСНОВНЫМИ НАПРАВЛЕНИЯМИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА ФГБУ «ВНИИЗЖ» ЯВЛЯЮТСЯ:

- проведение независимых испытаний пищевой продукции, продовольственного сырья и кормов для животных по показателям качества и безопасности, определяющим степень соответствия их нормам и требованиям действующих технических регламентов (ТР) Таможенного союза (ТС), ГОСТов, СанПиН и других нормативных документов (НД) Таможенного союза и Российской Федерации.

Испытательный центр ФГБУ «ВНИИЗЖ» проводит испытания продукции по следующим направлениям (область аккредитации):

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

1. Хлебобулочные и макаронные изделия.
2. Продукция сахарной промышленности (сахар-песок, сахар-рафинад).
3. Изделия кондитерские сахаристые.
4. Продукция винодельческой промышленности.
5. Продукция производства безалкогольных напитков.
6. Вода питьевая.
7. Мясо, субпродукты охлажденные, замороженные, мясные и растительные мясосодержащие консервы, мясные полуфабрикаты.
8. Продукция молочной и маслосыростроительной промышленности.

9. Пищевая масложировая продукция.
10. Непищевая масложировая продукция (глицерин натуральный дистиллированный, мыло хозяйственное).
11. Соковая продукция из фруктов и овощей.
12. Зерно и продукты его переработки.
13. Продукты рыбной промышленности.
14. Мёд, продукция пчеловодства.
15. Пищевые концентраты и крахмал.
16. Растительные масла, продукты переработки растительных масел.
17. Овощи.

КОРМА

1. Корма растительного происхождения.
2. Зерно злаковых, бобовых и масличных культур на кормовые цели.
3. Кормовые продукты перерабатывающей промышленности: жмыхи, шроты, отруби, жом сушеный.
4. Корма животного происхождения, жир кормовой.
5. Кормовые добавки минерального происхождения.
6. Комбикорма, премиксы, белково-витаминные добавки.

**По вопросам проведения исследований
обращаться по тел.: 8 (4922) 52-99-22**

Контакты:

Почтовый адрес: Россия, 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Сектор продаж ветпрепаратов на территории РФ: тел. (4922) 26-15-25, 26-15-51, 52-99-24

Сектор экспорта и импорта ветпрепаратов: тел. (4922) 26-18-56

Отдел маркетинга и рекламы: тел. (4922) 26-15-12, 26-19-88, 26-17-65 (доб. 24-34)

сайт: <http://www.arriah.ru>

канал на Youtube: <https://www.youtube.com/channel/UCVPBOvjZcxbEmJ1Qw3YYcw>