



003479218

На правах рукописи

Г —

Горобчук Елена Алексеевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОГО
КОНТРОЛЯ БЕЗОПАСНОСТИ И КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДСТВА
МЯСНЫХ КОНСЕРВОВ**

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

16.00.03 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

— 8 ОКТ 2009

АВТОРЕФЕРАТ*

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва 2009

Работа выполнена на кафедре «Товароведение и безопасность сырья и продуктов биотехнологии» в государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет прикладной биотехнологии» (ГОУ ВПО МГУПБ).

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Родин В.И. (ГОУ ВПО МГУПБ)

Научный консультант: доктор биологических наук,
Ярков С.П. (ФГУП «Гос НИИ БП»)

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Смирнова И.Р. (ГОУ ВПО МГУПБ);
доктор ветеринарных наук, профессор
Белоусов В.И. (ФГУ «ЦНМВЛ»)

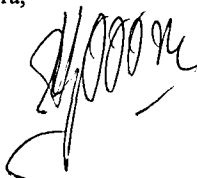
Ведущая организация: ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»

Защита состоится «23» Октября 2009 г. в 16-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.149.03 при ГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии» по адресу: 109316 Москва, ул. Талалихина 33.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии», а также на веб-сайте <http://www.msaab.ru>

Автореферат разослан «14» сентября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,
профессор



Серегин И.Г.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Развитие современной мясной промышленности связано с производством продуктов не только кратковременного, но и длительного срока годности, при котором осуществляется наиболее эффективное использование мясного сырья. К такому виду продукции относятся стерилизованные мясные консервы, основное преимущество которых заключается в возможности продолжительного хранения без потерь питательных и вкусовых качеств.

Начиная с 2005 г., в России наметился устойчивый рост производства мясных консервов. Этому способствовало увеличение импорта говядины и свинины, изменение видового ассортимента мясных консервов, а также повышение их спроса на отечественном рынке. В этой связи своевременное обеспечение контроля их качества и безопасности является важнейшей задачей по охране здоровья потребителя.

Основными критериями безопасности и качества выпускаемой консервной продукции являются микробиологические показатели, по которым контролируют ветеринарно-санитарное состояние перерабатываемого сырья, производственных помещений, оборудования и других объектов, а также соблюдение установленных технологических процессов (Ю.Г. Костенко, 2006; М.А. Шикина, 2006; E.J.Schantz, 1992).

Однако применяемые методы контроля требуют значительных затрат времени и материалов, что побуждает проведение научно-исследовательских работ по изысканию новых и совершенствованию действующих методов с целью сокращения времени исследования и получения достоверных результатов (М.А. Мамаев, 1999; Л.Б. Сметанина и др., 2005; В.В. Светличкин, 2005).

Для этого представляются перспективными методы ДНК- и иммунодиагностики (А.Я. Самуйленко, 2003; А.Ф. Валихов, И.Н. Комарова, 2004; И.Б. Бычкова, 2006), которые требуют усовершенствования с целью возможности их применения для ускоренного анализа мясного и растительного сырья, термообработанной продукции, а также идентификации микроорганизмов и выявления их токсинов (С.П. Ярков и др., 2007; Shashi K. Sharma et al., 2005).

При этом особое внимание должно быть уделено разработке экспрессных и ускоренных методов исследования объектов ветеринарного надзора, так как в практических условиях ветеринарные лаборатории выполняют значительный объем работ, связанных с бактериологическим контролем перерабатываемого пищевого сырья и санитарного состояния производства.

Цель исследований: совершенствование контроля безопасности и качества сырья и готовых консервов на основе ускоренных, чувствительных и специфичных методов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- оценить ветеринарно-санитарное состояние объектов консервного цеха, перерабатываемого мясного и растительного сырья, а также изучить качество и безопасность мясных консервов;

- усовершенствовать идентификацию *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* из мясного и растительного сырья при производстве мясных консервов на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией;

- разработать методику идентификации *S. typhimurium* из объектов ветеринарного контроля в консервном производстве с помощью индикаторных иммунохроматографических тест-систем с учетом их специфичности, чувствительности и продолжительности анализа;

- разработать методические подходы к выявлению ботулинического токсина в мясных консервах с помощью индикаторных иммунохроматографических элементов.

Научная новизна. Разработаны методические подходы для оценки качества и безопасности сырья, готовой продукции, а также ветеринарно-санитарного состояния объектов консервного производства на основе ускоренных методов ДНК- и иммунодиагностики. Разработаны и испытаны методики для выявления *S. typhimurium* и ботулинического токсина с помощью индикаторных иммунохроматографических элементов (ИИХЭ), включающие модифицированные этапы пробоподготовки с использованием дифференциального центрифугирования. Определена чувствительность, специфичность разработанных методов. Усовершенствована методика одновременной индикации *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* на основе амплификации с неспецифическими праймерами и последующей ДНК-гибридизацией со специфическими ДНК-зондами. Установлена корреляция результатов исследований, полученных с использованием общепринятых и предлагаемых методик, что доказывает возможность их комплексного или раздельного применения для обеспечения ветеринарно-санитарного контроля качества консервного производства.

Практическая значимость работы. На основании результатов исследований разработаны «Методические рекомендации по индикации сальмонелл группы В в сырье растительного и животного происхождения, мясных консервах и объектах внешней среды на основе индикаторных иммунохроматографических элементов» (п.п. 5.1, 6.2.1, 6.2.2, 6.3) (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 11.12.2008 г.). Материалы исследований включены в проект Национального стандарта Российской Федерации «Растительная продукция и корма, зерно. Экспресс-метод обнаружения специфичных белков». Научные разработки используются в учебном процессе по курсу «Ветеринарная санитария» и «Товароведение», а также на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей.

Апробация работы. Результаты исследований доложены на 4-й Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (М.: МГУПБ, 2002); 5-й Международной

конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции» (М.: МГУПБ, 2004).; VI Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» (М.: МГУПБ, 2007); Международной научно-практической конференции преподавателей, молодых ученых и аспирантов аграрных вузов РФ «Актуальные проблемы современного аграрного производства» (М.: РУДН, 2008); VII Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» (М.: МГУПБ, 2008); а также на расширенном заседании кафедры «Товароведение и безопасность сырья и продуктов биотехнологии» (2008 г.).

Публикации. Результаты исследований отражены в 10 научных работах, в том числе 3 статьях – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

За проект «Разработка экспресс-методов определения микробных контаминаций в продукции, технологическом оборудовании мясоперерабатывающих предприятий на основе иммунохроматографии» в 2007 году был получен грант ассоциации «Университетский комплекс прикладной биотехнологии».

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Ветеринарно-санитарная оценка мясного и растительного сырья, готовой продукции и объектов консервного производства.
2. Совершенствование идентификации *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* из мясного и растительного сырья для производства консервов на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией.
3. Разработка методики идентификации *S. typhimurium* с помощью индикаторных иммунохроматографических тест-систем.
4. Методические подходы к определению ботулинического токсина в мясных консервах с помощью индикаторных иммунохроматографических элементов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 124 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, выводов, предложений для практики, списка использованной литературы и приложений. Работа иллюстрирована 19 таблицами, 13 рисунками. Список литературы включает 140 источников отечественных и зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в течение 2001-2009 гг. на кафедре «Товароведение и безопасность сырья и продуктов биотехнологии» ветеринарно-санитарного факультета ГОУ ВПО МГУПБ.

Материалами и объектами исследований служили образцы мясного сырья (свинина и говядина охлажденная и замороженная в полутушах, замороженная

в блоках); образцы растительного сырья (сушеная морковь, сушеный лук); специи (перец черный молотый, перец белый горошком, лавровый лист); консервы перед стерилизацией; готовые мясные стерилизованные консервы; смывы с ограждающих конструкций, технологического оборудования, инструментов и внутрицехового транспорта; вода водопроводная питьевая.

Отбор проб и проведение скрининга мяса, растительного сырья и специй проводили согласно официально утвержденным и общепринятым методам по ГОСТ 10444.15-94 «Продукты пищевые. Методы определения КМАФАнМ»; ГОСТ 21237-75 «Мясо. Методы бактериологического анализа»; ГОСТ Р 51447-99 «Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб»; ГОСТ Р 50474-93 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)»; ГОСТ Р 50480-93 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*»; ГОСТ 29185-91 «Продукты пищевые. Методы выявления сульфитредуцирующих клостридий»; ГОСТ Р 51921-02 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения *L. monocytogenes*».

Проверка мясных консервов перед стерилизацией включала определение количества МАФАнМ; выявление спор мезофильных клостридий и термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (ГОСТ 10444.3-85 и ГОСТ 10444.5-85). Определение герметичности консервных банок, предназначенных для микробиологического анализа, проводили по ГОСТ 8756.18-70. Термостатирование консервов без изменения внешнего вида банок перед посевами осуществляли согласно ГОСТ 26669-85. При этом в готовых консервах определяли: количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КОЕ/г) по ГОСТ 10444.15-94, наличие роста жизнеспособных мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (ГОСТ 30425-97), наличие роста жизнеспособных мезофильных анаэробных микроорганизмов (ГОСТ 30425-97), плесени и дрожжи, КОЕ в 1 г по ГОСТ 10444.12-88, сульфитредуцирующие клостридии в 0,1 г по ГОСТ 29185-91.

В мясных консервах определяли массовую долю влаги, белка, жира и золы. Массовую долю влаги исследовали методом высушивания навески до постоянной массы, массовую долю жира – методом Сокслета, массовую долю белка – методом Кьельдаля, массовую долю золы – методом озоления навески в муфельной печи.

Анализ качества воды проводили согласно ГОСТ 18963 «Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа», ГОСТ Р 51593-2000 «Вода питьевая. Отбор проб», СанПиН 2.1.4.559-96 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

В работе использовали методы иммунохроматографии для определения *S. typhimurium* и ботулинического токсина; методы амплификации с последующей ДНК-гибридизацией для индикации *S. typhimurium*, *E. coli*, *Staph. aureus*; а также метод иммунодиффузии для определения видовой

принадлежности мясного сырья. Отдельные методические подходы при выполнении исследований приведены в соответствующих разделах.

Количественные показатели результатов исследований подвергали вариационно-статистическому анализу с использованием программного обеспечения PC Microsoft Excel 2003. Достоверность различий устанавливали по методу Стьюдента-Фишера (Плохинский Ш.А., 1970).

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Ветеринарно-санитарная оценка производства мясных консервов

Ветеринарно-санитарная оценка объектов консервного цеха

Качество получаемой консервированной продукции во многом зависит от ветеринарно-санитарного состояния предприятия (цеха).

С целью установления общей микробной загрязненности объектов консервного цеха, выявления бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл и сульфитредуцирующих клостридий отбирали и исследовали смывы в соответствии с инструкциями «По санитарной обработке технологического оборудования и производственных помещений на предприятиях мясной промышленности» (2003) и «Порядок санитарно-микробиологического контроля при производстве мяса и мясных продуктов» (1995). Всего бактериологическому контролю было подвергнуто 224 смыва, в т.ч. 112 - отобранных до проведения дезинфекции и 112 смывов, взятых после санитарной обработки объектов. Исследованиями установлено, что в течение рабочей недели (до проведения дезинфекции) на поверхностях объектов цеха накапливается достаточно большое количество микроорганизмов, в т.ч. и бактерии группы кишечных палочек. Так, общая бактериальная обсемененность пола составила $(4,74 \pm 0,23) \cdot 10^5$ КОЕ/см², нижних частей стен – $(3,25 \pm 0,17) \cdot 10^5$ КОЕ/см². Такая же высокая обсемененность отмечена на поверхностях напольных тележек $(3,50 \pm 0,16) \cdot 10^5$ КОЕ/см². В их числе в 10-20% случаев выявлены бактерии группы кишечных палочек и в 7-10 % - сульфитредуцирующие клостридии. В то же время отмечена относительно низкая бактериальная загрязненность волчка, куттера, закаточной машины и инструментов. Это объясняется тем, что в конце каждой рабочей смены в цехе проводится мойка оборудования с применением горячей воды (60 - 70 °С) или химических моющих средств. Кроме этого, мусаты и ножи в течение смены 2-3 раза подвергают очистке и дезинфекции методом погружения в 1,5%-й раствор РИК-Д при экспозиции 30 мин. И, тем не менее, полученные данные свидетельствуют о необходимости контроля за технологией проведения санитарной обработки объектов цеха, так как режим дезинфекции позволяет уничтожать на поверхностях все неспоровые микроорганизмы, находящиеся на объектах консервного цеха. Этот вывод подтверждают данные бактериологических исследований смывов с объектов консервного цеха после проведения дезинфекции 2%-м раствором РИК-Д при экспозиции 3 ч. (табл. 1).

Таблица 1 - Санитарно-микробиологическая оценка смывов с объектов консервного цеха до и после санитарнойобработки

Объект исследования	Кол-во исследованных смывов		КМАФАнМ, КОЕ/см ²		Кол-во выявленных смывов от числа исследованных					
					БГКП		Сальмонеллы		Сульфит-редуцирующие клостридии	
	До и после мойки и дезинфекции									
	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после
Напольная тележка	10	10	$(3,50 \pm 0,16) \cdot 10^5$	$(2,2 \pm 0,10) \cdot 10^2$	2	–	–	–	1	–
Волчок	10	10	$(1,34 \pm 0,06) \cdot 10^5$	$(1,6 \pm 0,07) \cdot 10^2$	–	–	–	–	–	–
Куттер	12	12	$(1,52 \pm 0,07) \cdot 10^5$	$(1,6 \pm 0,08) \cdot 10^2$	–	–	–	–	–	–
Мешалка	10	10	$(1,10 \pm 0,05) \cdot 10^5$	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^2$	–	–	–	–	–	–
Лента транспортера	10	10	$(1,89 \pm 0,09) \cdot 10^5$	$(2,0 \pm 0,10) \cdot 10^2$	1	–	–	–	–	–
Закаточная машинка	10	10	$(1,20 \pm 0,05) \cdot 10^5$	$(1,7 \pm 0,07) \cdot 10^2$	–	–	–	–	–	–
Ножи	12	12	$(0,65 \pm 0,03) \cdot 10^5$	$(0,83 \pm 0,04) \cdot 10^2$	–	–	–	–	–	–
Мусаты	12	12	$(0,57 \pm 0,02) \cdot 10^5$	$(0,62 \pm 0,03) \cdot 10^2$	–	–	–	–	–	–
Пол	14	14	$(4,74 \pm 0,23) \cdot 10^5$	$(2,74 \pm 0,13) \cdot 10^2$	2	–	–	–	1	–
Стены (нижняя часть)	12	12	$(3,25 \pm 0,17) \cdot 10^5$	$(2,25 \pm 0,12) \cdot 10^2$	2	–	–	–	1	–

Примечание: – (минус) – микроорганизмы не обнаружены;

БГКП – бактерии группы кишечных палочек;

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Например, общая бактериальная обсемененность пола не превышала $(2,74 \pm 0,13) \cdot 10^2$, стен – $(2,25 \pm 0,12) \cdot 10^2$, напольных тележек – $(2,2 \pm 0,10) \cdot 10^2$ КОЕ/см². Отмечена низкая обсемененность технологического оборудования – от $(1,6 \pm 0,07) \cdot 10^2$ до $(2,0 \pm 0,10) \cdot 10^2$ КОЕ/см² и инструментов – от $(0,62 \pm 0,03) \cdot 10^2$ до $(0,83 \pm 0,04) \cdot 10^2$ КОЕ/см². При этом не были выявлены бактерии группы кишечных палочек, сальмонеллы и сульфитредуцирующие клостридии.

Таким образом, результаты выполненных исследований позволяют заключить, что микробная загрязненность объектов консервного цеха к концу рабочей недели достаточно высока и необходима их механическая очистка, мойка и дезинфекция, что позволит содержать цех на требуемом ветеринарно-санитарном уровне.

В консервном производстве важное значение придают санитарному состоянию используемой питьевой воды, так как её качество непосредственно влияет на безопасность вырабатываемой продукции. Для этого нами было подвергнуто бактериологическому контролю 137 проб воды.

Результаты исследований показали, что вода, поступающая непосредственно в консервный цех в весенний и осенний сезоны года не отвечает установленным санитарно-гигиеническим требованиям, так как в ней в 7,1-12,5 % случаев обнаружены бактерии группы кишечных палочек, хотя количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов находилось в пределах нормы (от $44,3 \pm 2,1$ до $47,5 \pm 2,5$ КОЕ/см³). Полученные данные свидетельствуют об имевшем место неэффективном обеззараживании водопроводной воды на стадии водоподготовки или о бактериальной обсемененности внутренней поверхности водопроводной системы на момент отбора проб. В то же время, в летний и зимний сезоны года в воде, поступающей на завод, патогенные микроорганизмы не были выявлены, а общее микробное число не превышало $41,1 \pm 2,5$ КОЕ/см³. Аналогичные данные получены нами при бактериологическом исследовании воды, отобранной из чана для охлаждения консервов после стерилизации.

Заслуживают внимания результаты исследования проб воды, взятых из чана для определения герметичности консервных банок до стерилизации. В данном случае, исследованная вода была практически стерильной. Видимо это объясняется тем, что температура воды в чане постоянно поддерживается на уровне 85-87 °С.

Контроль безопасности сырья для производства мясных консервов

Пищевое сырье, используемое для изготовления мясных консервов, может быть обсеменено различной микрофлорой, характерной для мяса и ингредиентов растительного происхождения.

Интенсивность микробного загрязнения мяса и его видовая принадлежность зависят от многих факторов, в частности, от несоблюдения ветеринарно-санитарных правил убоя животных, разделки, транспортировки и

хранения продуктов убоя, нарушения требований, предъявляемых к технологическим процессам, санитарии и гигиены производства и др.

Нами были проведены бактериологические исследования 67 проб говядины и 71 пробы свинины, предназначенных для производства мясных консервов. Пробы отбирали от охлажденного, замороженного в полутушах и замороженного в блоках мясного сырья.

Результаты микробиологического исследования мяса представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Результаты микробиологического контроля мясного сырья

Материал исследования	Кол-во исследованных проб	КМАФАнМ, КОЕ/г		Кол-во выявленных проб от числа исследованных			
		Норма*, не более	Результат	БГКП	Сальмонеллы	Сульфитредуцирующие клостридии	L.monocytogenes
Свинина охлажденная в полутушах)	29	$1 \cdot 10^3$	$(0,84 \pm 0,04) \cdot 10^3$	-	-	-	-
Свинина замороженная в блоках	21	$5 \cdot 10^5$	$(2,21 \pm 0,25) \cdot 10^5$	1	-	-	-
Свинина замороженная в полутушах	21	$1 \cdot 10^4$	$(0,98 \pm 0,06) \cdot 10^4$	-	-	-	-
Говядина охлажденная в полутушах	21	$1 \cdot 10^3$	$(0,92 \pm 0,04) \cdot 10^3$	-	-	-	-
Говядина замороженная в блоках	28	$5 \cdot 10^5$	$(2,84 \pm 0,11) \cdot 10^5$	1	-	1	-
Говядина замороженная в полутушах	18	$1 \cdot 10^4$	$(0,89 \pm 0,07) \cdot 10^4$	-	-	-	-

Примечание: - (минус) – микроорганизмы не обнаружены;
 БГКП – бактерии группы кишечных палочек;
 КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов
 * - по СанПиН 2.3.2.1078-01

Из табл. 2 следует, что в пробах охлажденной свинины количество МАФАнМ (КОЕ/г) составляло $(0,84 \pm 0,04) \cdot 10^3$, замороженной в полутушах – $(0,98 \pm 0,06) \cdot 10^4$, замороженной в блоках – $(2,21 \pm 0,25) \cdot 10^5$. Несмотря на то, что общая бактериальная обсемененность свинины замороженной в блоках не превышала установленной нормы, в одном случае из 21 были выявлены бактерии группы кишечных палочек (БГКП).

Аналогичные данные получены по бактериальной обсемененности говядины. В охлажденной говядине количество МАФАнМ (КОЕ/г) не превышало $(0,92 \pm 0,04) \cdot 10^3$, замороженной в полутушах – $(0,89 \pm 0,07) \cdot 10^4$, замороженной в блоках – $(2,84 \pm 0,11) \cdot 10^5$. В числе последних выявлены БГКП и сульфитредуцирующие клостридии.

Результаты исследований показывают, что общая бактериальная обсемененность говядины и свинины находится на пределе допустимой нормы. Это связано с обсеменением мяса микроорганизмами в процессе транспортировки, хранения, обвалки и контакта с воздухом производственных помещений. Несмотря на это, при дальнейшем бактериологическом контроле в свинине и говядине сальмонеллы и листерии не выявлены.

Наряду с микробиологическим контролем нами были выполнены исследования по определению видовой принадлежности мясного сырья, хотя этот показатель не является показателем безопасности мяса в соответствии с действующими СанПиН 2.3.2.1078-01. Однако фальсификация мяса одного вида другим не допускается. Существует ряд методов идентификации мяса, основанных на морфологических показателях, но при поступлении блочного мяса идентификация по указанным показателям затруднена. В данном случае применяются гистологические, иммунологические методы и методы на основе ДНК-диагностики.

Для идентификации блочного мяса на основе метода иммунодиффузии использовали тест-системы серии ORBIT, PRIME, SOFT (США). Интерпретацию результатов проводили по линии преципитации между диском с исследуемой пробой и диском, пропитанным соответствующими антителами к белкам определенного вида мяса. Метод иммунодиффузии четко позволял идентифицировать видовую принадлежность мясного сырья, поступающего для производства консервов.

В ряде случаев, в зависимости от избранной рецептуры, в мясные консервы добавляют определенное количество ингредиентов растительного происхождения, таких как лук и морковь в сушеном виде, а также специи – перец и лавровый лист. Перед закладкой в консервы они подвергаются входному бактериологическому контролю с учетом возможной контаминации овощей и специй патогенными микроорганизмами (в т.ч. анаэробами) в период сбора и обработки (очистки, нарезки, сушки).

Бактериологическому контролю подвергли 36 проб сушеной моркови, 33 – сушеного лука, 30 – перца черного молотого, 30 – перца белого (горошек) и 33 – лаврового листа.

В результате исследований установлено, что общая бактериальная обсемененность ингредиентов растительного происхождения находится в пределах допустимых норм. Обсемененность моркови не превышала $(5,2 \pm 0,3) \cdot 10^4$, лука - $(1,7 \pm 0,08) \cdot 10^3$, перца черного молотого - $(9,0 \pm 0,5) \cdot 10^4$, перца белого (горошек) - $(6,1 \pm 0,33) \cdot 10^5$, лаврового листа - $(4,8 \pm 0,2) \cdot 10^5$ КОЕ/г. При этом из сушеной моркови, в одном случае из 36, выявлены сульфитредуцирующие клостридии. Из всех проб исследованных ингредиентов не выделены термофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы и бактерии группы кишечных палочек.

В соответствии с действующими нормативными документами («Инструкция о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания», 1993) бактериологическому контролю подлежат консервы перед стерилизацией. В этой связи нами были проведены микробиологические исследования 58 банок свиных и говяжьих консервов до поступления на термическую обработку. Исследованиями было установлено, что общее количество микроорганизмов в порционированной говядине составляло $(1,74 \pm 0,08) \cdot 10^5$ КОЕ/г, свинине – $(1,90 \pm 0,09) \cdot 10^5$ КОЕ/г., т.е. в пределах допустимой нормы (норма – не более $2,0 \cdot 10^5$ КОЕ/г). При этом в мясе не были обнаружены споры мезофильных клостридий и термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, сальмонеллы и листерии, но в 3,3-3,6 % случаев были выявлены бактерии группы кишечных палочек.

Исследование качественных показателей мясных консервов

Стерилизованные консервы подвергали исследованию по микробиологическим и химическим показателям качества.

Микробиологический анализ готовой продукции проводили на соответствие требованиям промышленной стерильности. В результате исследования консервов установлена их полная стерильность.

При химическом анализе определяли массовую долю влаги, жира, белка и золы методами, общепринятыми в лабораторной практике. Предварительно консервы проверяли на наличие физического брака (банки с вибрирующими концами, банки-хлопуши, деформированные банки, ложный бомбаж, подтеки банок и др.) и на герметичность. После вскрытия консервов «Говядина тушеная» и «Свинина тушеная» регистрировали органолептические показатели. Установлено, что цвет мяса от желтого до светло-коричневого, вкус свойственный тушеной говядине и свинине с пряностями без постороннего запаха и привкуса, мясо кусочками, не переваренное, сочное, без грубой соединительной ткани, хрящей, сухожилий.

Результаты химических исследований 50 банок консервов показали, что их стерилизация при температуре 115 °С в течение 70 мин не приводит к значительному снижению питательных веществ. В говяжьих мясных консервах

содержание протеина составило $17,3 \pm 0,52$ %, жира – $17,8 \pm 0,71$ % при влаге – $63,1 \pm 2,8$ %.

Аналогичные данные получены при исследовании консервов из свинины. Отмечено высокое содержание белка $14,5 \pm 0,55$ % и жира $31,6 \pm 1,5$ %, что свойственно исходному сырью – свинине.

2.2.2. Совершенствование идентификации *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* в мясном и растительном сырье на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией

Методы определения микробных контаминаций мясного и растительного сырья для производства консервов относительно продолжительны и трудоемки. Поэтому дальнейшим этапом наших исследований явилось совершенствование контроля микробного обсеменения сырья с помощью методов на основе ДНК и иммунодиагностики.

Для идентификации *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* в мясном и растительном сырье, используемом при производстве мясных консервов, нами усовершенствована методика на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией. Для этого исследуемые образцы сырья гомогенизировали, микроорганизмы элюировали, подращивали их на жидких питательных средах и после этого осаждали центрифугированием при 8000 g. Осадок элюировали в буфере для лизиса, содержащем лизоцим и протеиназу К. ДНК осаждали этанолом. Осадок элюировали в буфере для амплификации, а ликвоты амплифицировали с неспецифическими нуклеотидными праймерами, мечеными биотином. Полученные ампликоны гибридизовали с иммобилизованными на нитроцеллюлозных фильтрах специфичными ДНК-зондами. ДНК-зонды получали в реакции амплификации с использованием праймеров: *Staphylococcus aureus*: Sa442-1 (5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3'), позиция с 5 по 34; Sa 442-2 (5'-CGT GAG ATT TGA GAT AAT ACA ACA-3'), позиция с 83 по 112; *Stn* гена основного токсина *Salmonella typhimurium*; *fim A* структурного гена *Escherichia coli*. После проведения гибридизации добавляли конъюгат стрептавидинфосфатазу, субстрат и краситель. Результаты определяли по окрашиванию точек с гибридными молекулами.

Предложенная нами усовершенствованная методика выявления ДНК микроорганизмов отличается от общепринятой методики и позволяет проводить одновременную индикацию *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* на основе амплификации с неспецифическими праймерами и последующей ДНК-гибридизацией со специфическими ДНК-зондами.

С целью установления достоверности полученных результатов исследований одна часть мясного сырья была искусственно контаминирована смесью суточных агаровых культур: *E. coli* + *S. typhimurium* + *Staph. aureus*; *E. coli* + *Staph. aureus* по $(10,0 \pm 1,0)$ тыс.м.к./г каждого вида микроорганизмов, а другая - обработана стерильной дистиллированной водой и служила контролем.

Полученные результаты исследований по идентификации тест-микроорганизмов методом на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией были подтверждены бактериологическими анализами (табл. 3).

Таблица 3 - Контроль микробных контаминаций мясного сыра бактериологическим и методом ДНК-диагностики

Объект исследования	Результаты идентификации					
	ДНК-диагностика			Бактериологический метод		
	E. coli	S. typhimurium	Staph. aureus	E. coli	S. typhimurium	Staph. aureus
Говядина (E. coli + S. typhimurium + Staph. aureus)	+	+	+	+	+	+
Говядина (контроль)	-	-	-	-	-	-
Говядина (E. coli + Staph. aureus)	+	-	+	+	-	+
Говядина (контроль)	-	-	-	-	-	-
Свинина (E. coli + S. typhimurium + Staph. aureus)	+	+	+	+	+	+
Свинина (контроль)	-	-	-	-	-	-

Примечание: + (плюс) - микроорганизмы выявлены;
- (минус) - микроорганизмы не выявлены

Таблица 4 - Контроль микробных контаминаций мясного и растительного сыра методом ДНК-диагностики

Объект исследования	Результаты идентификации		
	E. coli	S. typhimurium	Staph. aureus
Мясное сырье	-	-	-
Растительное сырье	-	-	-
Специи	-	-	-
ДНК E. coli (положительный контроль)	+	-	-
ДНК S. typhimurium (положительный контроль)	-	+	-
ДНК Staph. aureus (положительный контроль)	-	-	+
ДНК Bac. subtilis (отрицательный контроль)	-	-	-

Примечание: + (плюс) - наличие реакции гибридизации;
- (минус) - отсутствие реакции гибридизации

Используя данную методику, нами проведен анализ микробной контаминации свинины и говядины (замороженной, охлажденной в блоках и

полутушак), растительного сырья (сушеная морковь и сушеный лук), а также специй (перец черный молотый, перец белый горошком, лавровый лист).

Как видно из данных, представленных в табл. 4, в исследуемых пробах сырья для производства мясных консервов с помощью предложенной нами методики *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* обнаружены не были. При этом положительные контроли, проявляющиеся во всех анализах, указывали на специфичность тест-системы (в качестве положительных контролей использовали очищенные ДНК *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus*).

Таким образом, модифицированная методика позволяет с высокой специфичностью выявлять микроорганизмы различных видов и проводить анализ в течение 17-18 ч при обогащении микроорганизмов.

2.2.3. Разработка методики идентификации S. typhimurium и ботулинического токсина с помощью индикаторных иммунохроматографических тест-систем в консервном производстве

Разработка методики идентификации *S. typhimurium* в сырье и смывах с помощью индикаторных иммунохроматографических тест-систем

Другим методом экспрессного анализа микробных контаминаций мясного сырья, готовой продукции и контроля санитарного состояния объектов консервного производства является использование иммунохроматографических тест-систем.

В качестве индикаторных тест-систем использовали опытные образцы индикаторных иммунохроматографических элементов производства ГНЦ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения» (рис. 1).

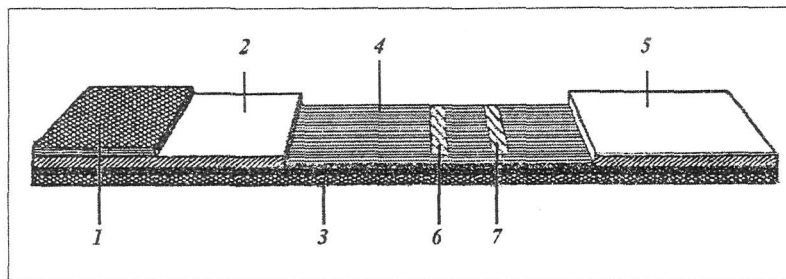


Рис.1 Схема построения ИИХЭ:

1 – подложка для нанесения исследуемого образца; 2 – подложка, содержащая конъюгат коллоидного золота и антител; 3 – полимерная подложка, обеспечивающая механическую прочность сборки; 4 – нитроцеллюлозная мембрана; 5 – подложка для впитывания образца; 6 – антитела аналитической зоны; 7 – антитела контрольной зоны.

Образец наносили на мембрану фильтра, где он реагировал с частицами коллоидного золота, покрытыми антителами. Затем смешанный комплекс поступал на иммунохроматографическую мембрану, которая имеет «аналитическую» и «контрольную зону». Аналитическая зона захватывала бактерии с определенными отдельными антигенами, позволяя окрашенным частицам коллоидного золота концентрироваться и образовывать видимую линию (полосу). Положительный образец, содержащий бактерии со специфичными антигенами, давал видимую полосу в аналитической и контрольной зонах. Негативный образец не давал видимой линии в аналитической зоне. В контрольной зоне окрашенная полоска наблюдалась всегда, что свидетельствовало о пригодности индикаторного элемента. Помимо визуальной оценки результатов иммунохроматографического теста использовали отечественный видеоцифровой анализатор «Рефлеком», позволяющий оценивать интенсивность окрашивания линий иммунохроматограммы.

Для определения чувствительности индикаторных иммунохроматографических элементов были проведены модельные эксперименты на примере музейной культуры *S. typhimurium*.

Исследования показали, что тест на наличие антигена *S. typhimurium* является одноэтапным иммунохроматографическим тестом, который позволяет выявить $1,0 \cdot 10^5$ м.к./мл и более микроорганизмов. Чувствительность индикации микроорганизмов с помощью иммунохроматографических тест-систем можно повысить путем предварительного обогащения культур.

С целью выявления специфичности иммунохроматографической тест-системы нами были проведены исследования бактериальных культур, в которой *S. typhimurium* дифференцировали от других видов микроорганизмов.

Таблица 5 - Результаты индикации *S. typhimurium* с помощью иммунохроматографических тест-систем на *S. typhimurium*

Исследуемые бактерии	Результаты окрашивания тест-зоны иммунохроматографического элемента на <i>S. typhimurium</i>
<i>E. coli</i>	—
<i>S. typhimurium</i>	+
<i>Staph. aureus</i>	—
<i>S. dublin</i>	—
<i>L. monocytogenes</i>	—
<i>Y. enterocolitica</i>	—
<i>E. coli</i> + <i>Staph. aureus</i> (1:1)	—
<i>S. typhimurium</i> + <i>E. coli</i> + <i>Y. enterocolitica</i> (1:1:1)	+

Примечание: + (плюс) - наличие окрашивания;
— (минус) - отсутствие окрашивания

Исследованиями установлено, что индикаторная иммунохроматографическая тест-система четко дифференцирует *S. typhimurium* от *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *Staph. aureus*, а также от сальмонелл других серовариантов (табл. 5).

Полученные данные позволили применить метод для контроля мясного сырья и санитарного состояния цехов мясокомбинатов на наличие *S. typhimurium*. Для этого нами была разработана и испытана методика подготовки проб и смывов к проведению исследований. Мясное сырье гомогенизировали и элюировали микроорганизмы буферным раствором, затем подготовленные пробы сырья и смывы подвергали очистке от крупных частиц и концентрировали микроорганизмы с помощью дифференциального центрифугирования в интервалах 200-15000 г. Для повышения чувствительности метода можно проводить предварительное обогащение микроорганизмов в жидкой питательной среде.

С целью установления достоверности выявления *S. typhimurium* из мясного сырья предварительно опыты проводили в лабораторных условиях. Для этого часть проб мяса (говядина) искусственно обсеменяли суточной агаровой культурой сальмонелл из расчета 10,0-12,0 тыс. м.к./г. Другую часть мясного сырья не обсеменяли, и она служила контролем.

Таблица 6 – Результаты контроля мясного сырья на обнаружение *S. typhimurium*

Объект исследования	Количество исследованных проб	Методы контроля	
		Иммунохромато- графический	Бактериологический
С применением обогащения тест-культур *			
Говядина (опыт)	20	—	+
Говядина (контроль)	10	—	—
С применением обогащения тест-культур **			
Говядина (опыт)	19	+	+
Говядина (контроль)	10	—	—
Без применения обогащения тест-культур ***			
Говядина (опыт)	18	+	+
Говядина (контроль)	10	—	—

Примечание: + (плюс) сальмонеллы выявлены;

— (минус) сальмонеллы не обнаружены;

* - обогащение с начальной концентрацией $3,12 \cdot 10^4$ м.к./г;

** - обогащение с начальной концентрацией $6,25 \cdot 10^4$ м.к./г;

*** - без обогащения с начальной концентрацией $1,25 \cdot 10^5$ м.к./г.

Подготовку отобранных проб к анализу проводили в соответствии с разработанной методикой с применением и без применения обогащения тест-культур. Параллельно мясное сырье исследовали бактериологическим методом. Результаты испытаний представлены в табл. 6.

Исследованиями установлено, что из 87 проб мясного сырья, подвергнутых анализу иммунохроматографическим методом, дали положительные результаты пробы, в которых концентрация сальмонелл превышала $6,25 \cdot 10^4$ м.к./г.

Таким образом, иммунохроматографический метод может быть использован при проведении скрининговых исследований мясного сырья на наличие сальмонелл, так как время проведения анализа (без обогащения материала) с учетом пробоподготовки составляет не более 60 мин.

Разработка методики выявления ботулинического токсина в мясных консервах с помощью индикаторных иммунохроматографических тест-систем

С целью определения чувствительности и возможности применения индикаторных иммунохроматографических элементов для выявления ботулинического токсина готовили разведения препарата ботулинического анатоксина тип А (производство ФГУП НПО «Микроген»), которые наносили на индикаторный иммунохроматографический элемент.

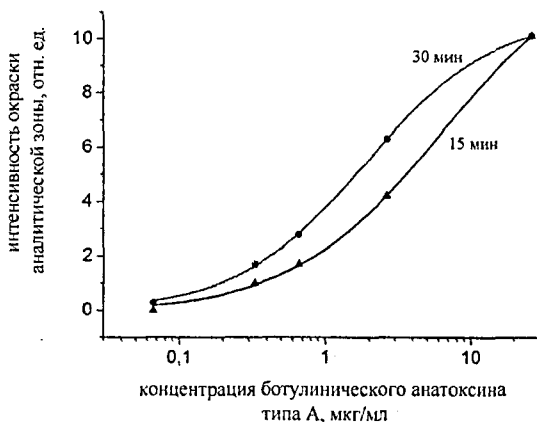


Рис. 2 Зависимость окрашивания аналитической зоны индикаторного элемента, измеренная прибором «Рефлеком», от концентрации ботулинического анатоксина типа А, при обнаружении иммунохроматографическим методом в модельных растворах. Время протекания реакции 15 и 30 мин

Регистрацию результатов проводили спустя 15 и 30 мин после начала анализа с помощью прибора «Рефлеком».

Как показали исследования, чувствительность индикации составляет 300 нг анатоксина/мл, а оптимальное время анализа лежит в диапазоне 25-30 мин. Следует отметить, что в препарате анатоксина присутствовали балластные белки, а его иммунохимическая реактивность ниже, чем у нативного токсина.

Для более корректной оценки чувствительности индикаторных элементов в ФГУП «ГосНИИБП» были проведены исследования по изучению чувствительности индикаторных элементов для выявления ботулинического токсина, полученного из культуральной жидкости *Clostridium botulinum*. Чувствительность индикаторных элементов, подтвержденная биологическими пробами, составляет 3,0 нг/мл.

С целью установления достоверности выявления ботулинического токсина из мясных консервов нами была разработана и испытана методика подготовки проб к проведению исследований. Отобранные образцы консервов гомогенизировали и элюировали буферным раствором, подвергали очистке от крупных частиц при низкоскоростном центрифугировании с целью сохранения максимального количества токсина в образце. Затем супернатант наносили на подложку индикаторного элемента.

Разработанный иммунохроматографический метод испытывали на 32 образцах мясных консервов. В качестве положительного контроля использовали ботулинический анатоксин, а в отрицательном контроле - буферный раствор.

Результаты исследований показали, что иммунная реакция «антиген-антитело» происходила там, где в качестве антигена использовался ботулинический анатоксин. В то же время в исследованиях с использованием буферного раствора подобная реакция не была отмечена.

Результаты испытания иммунохроматографического метода для выявления *S. typhimurium* и ботулинического токсина в консервном производстве

Для подтверждения экспериментальных исследований, выполненных в лабораторных условиях, нами были проведены производственные испытания иммунохроматографического метода непосредственно в условиях консервного цеха мясоперерабатывающего завода.

В процессе выполнения работы по обнаружению *S. typhimurium* были исследованы 40 проб говядины и свинины, 69 смывов с поверхностей ограждающих конструкций и технологического оборудования, а также 63 пробы мясных консервов для выявления ботулинического токсина. В результате выполненных исследований ни в одном случае не были обнаружены *S. typhimurium* (результаты были подтверждены бактериологическим методом) и ботулинический токсин.

При этом необходимо отметить следующие преимущества иммунохроматографического метода: компактность аналитической системы, возможность визуальной оценки результатов анализа, экспрессность (воспроизведение метода в течение 1 ч), высокая специфичность (действует избирательно, реагируя только на определенный антиген).

2.2.4. Экономическая эффективность внедрения иммунохроматографического метода для контроля консервного производства

Экономическую эффективность рассчитывали методом приведенных затрат, производимых при исследовании одной пробы мяса и одной пробы мясных консервов в производственных лабораториях с помощью индикаторных иммунохроматографических элементов по сравнению с классическими методами.

Согласно установленному прейскуранту на 01.04.2009 цена индикаторного иммунохроматографического элемента для выявления *S. typhimurium* и ботулинического токсина типа А составляет 120 руб. за каждый. Стоимость исследования одной пробы биологического материала (мясо, овощные и мясные консервы и т.п.) на исключение сальмонелл в среднем составляет 376 руб., а ботулинического токсина – 630 руб.

Затраты на проведение исследования мяса иммунохроматографическим методом составляют 276, 4 руб., а консервов – 278,2 руб.

Таким образом, предполагаемый экономический эффект от внедрения иммунохроматографического метода исследования 1000 проб мяса на выявление сальмонелл составит: 99,6 тыс.руб., а ботулинического токсина в мясных консервах – 351,8 тыс.руб. Высокая коммерческая стоимость исследования биологических материалов на выявление ботулинического токсина связана с постановкой биопробы на лабораторных животных.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствован контроль качества и безопасности мясного сырья и вырабатываемых из него консервов на основе ускоренных методов иммунохроматографии и амплификации с последующей ДНК-гибридизацией. Показана высокая специфичность, экспрессность методов и корреляция результатов исследований с общепринятыми бактериологическими методами.
2. Общая бактериальная обсемененность поверхностей ограждающих конструкций и оборудования консервного цеха к концу рабочей недели находилась в пределах от $(1,10 \pm 0,05) \cdot 10^5$ до $(4,74 \pm 0,23) \cdot 10^5$ КОЕ/см². После проведения влажной дезинфекции 2%-м раствором РИК-Д этот показатель снижается от $(1,6 \pm 0,07) \cdot 10^2$ до $(2,74 \pm 0,13) \cdot 10^2$ КОЕ/см².

3. Установлена зависимость бактериальной обсемененности водопроводной питьевой воды, поступающей в консервный цех. В весенний и осенний периоды года на момент отбора проб в 7,1-12,5 % случаев выявлены бактерии группы кишечных палочек, хотя количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов находилось в пределах нормы (от $44,3 \pm 2,1$ до $47,5 \pm 2,5$ КОЕ/см³). В летний и зимний сезоны года в воде патогенные микроорганизмы не обнаружены.
4. Общая бактериальная обсемененность мясного сырья, используемого для производства консервов находится в пределах допустимой нормы. Однако в мясе, поступающем в блоках, выявлены бактерии группы кишечных палочек в 3,6-4,7 % случаев.
5. Усовершенствована методика на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией, позволяющая с высокой специфичностью проводить одновременную индикацию *E. coli*, *S. typhimurium* и *Staph. aureus* в мясном и растительном сырье, а также сокращающая, по сравнению с общепринятым бактериологическим методом, время анализа в 2,3 раза.
6. Разработаны методики выявления *S. typhimurium* и ботулинического токсина с помощью индикаторных иммунохроматографических элементов, чувствительность которых составляет $1,0 \cdot 10^5$ м.к./г и 3 нг/мл соответственно.
7. Установлена возможность практического применения индикаторных иммунохроматографических элементов для проведения исследований, в т.ч. и скрининговых, по выявлению сальмонелл в мясном, растительном сырье и объектах консервного производства, а также ботулинического токсина в готовой продукции в течение 1-2 ч.
8. Предполагаемый экономический эффект за счет применения индикаторных иммунохроматографических элементов при выявлении сальмонелл и ботулинического токсина составит 99,6 и 351,8 тыс. руб. соответственно на 1000 исследований.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

По материалам исследований разработаны «Методические рекомендации по индикации сальмонелл группы В в сырье растительного и животного происхождения, мясных консервах и объектах внешней среды на основе иммунохроматографических индикаторных элементов» (п.п. 5.1, 6.2.1, 6.2.2, 6.3) (утв. Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 11.12.2008 г.).

Методические рекомендации могут быть использованы в производственных лабораториях и лабораториях при продовольственных рынках, базах и других объектах ветеринарного надзора для ветеринарно-санитарной экспертизы сырья и продуктов растительного происхождения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Полякова Е.А. Санитарно-микробиологические показатели мясных консервов / Е.А. Полякова, Т.Н. Сорокина // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции: материалы 4-й Международной научно-практической конференции. – М.: МГУПБ, 2002. – С. 150-152.
2. Полякова Е.А. Контроль безопасности и качества мясных консервов при сертификации / Е.А. Полякова, Т.Н. Сорокина // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции: материалы 4-й Международной научно-практической конференции. – М.: МГУПБ, 2002. – С. 152-153.
3. Горобчук Е.А. Совершенствование методов оценки безопасности и качества при производстве мясных консервов / Е.А. Горобчук // Живые системы и биологическая безопасность населения: материалы 6-й Международной научной конференции студентов и молодых ученых. – М.: МГУПБ, 2007. – С. 307.
4. Горобчук Е.А. Идентификация видового состава мясного сырья методом иммунодиффузии при производстве стерилизованных мясных консервов / Е.А. Горобчук // Актуальные проблемы современного аграрного производства: материалы Международной научно-практической конференции преподавателей, молодых ученых и аспирантов аграрных вузов РФ. – М.: РУДН, 2008. – С.66-68.
5. Горобчук Е.А. Ускоренные методы контроля консервов / Е.А. Горобчук, В.И. Родин, В.В. Светличкин, В.П. Яремчук // Мясные технологии. – 2008. - №8. – С. 34-36.
6. Горобчук Е.А. Определение критериев безопасности и качества при производстве мясных консервов / Е.А. Горобчук // Вестник российского университета дружбы народов. – 2008. - №1. – С. 5-11.
7. Горобчук Е.А. Экспресс-методы определения качества при производстве мясных стерилизованных консервов / Е.А. Горобчук // Вестник Кыргызского аграрного университета. - Бишкек, 2008. – № 3. – Т. 11. - С.131-134.
8. Горобчук Е.А. Идентификация мясного сырья при производстве стерилизованных мясных консервов / Е.А. Горобчук // Живые системы и биологическая безопасность населения: материалы 7-й Международной научной конференции студентов и молодых ученых. – М.: МГУПБ, 2008. – С. 234.
9. Горобчук Е.А. Совершенствование контроля безопасности и качества при производстве мясных консервов на основе ДНК- и иммунодиагностики / Е.А. Горобчук // Ветеринария и кормление. – 2009.- №3. – С.28-29.
10. Горобчук Е.А. Ветеринарно-санитарный контроль мясного сырья и консервов с применением усовершенствованных методов / Е.А. Горобчук // Достижения науки и техники АПК. – 2009. - №5. – С.62-64.

Подписано в печать 15.09.2009. Усл. печ. л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 09/21
МГУПБ. 109316, Москва, ул. Талалихина, 33.
ООО «Полисувенир». 109316, Москва, ул. Талалихина, 33.
Тел. 677-03-86