

На правах рукописи

Глазунова Надежда Владимировна

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО
КОНТРОЛЯ ЗА КАЧЕСТВОМ И БЕЗОПАСНОСТЬЮ ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Ставрополь - 2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО
«Донской государственной аграрный университет» (пос.Персиановский)

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор, Почетный
работник науки и техники РФ
Малышева Людмила Александровна

Официальные оппоненты: Агольцов Валерий Александрович, доктор
ветеринарных наук, ФГБОУ ВПО «Саратовский
государственный аграрный университет им. Н.И.
Вавилова», профессор кафедры «Паразитология,
эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Черных Олег Юрьевич, доктор ветеринарных наук,
ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная
лаборатория», директор лаборатории

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия им. П. А. Столыпина»

Защита состоится « 18 » декабря 2014 года в 13.30 часов на заседании
диссертационного совета Д 220.062.02 при ФГБОУ ВПО «Ставропольский
государственный аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер.
Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО
«Ставропольский государственный аграрный университет» и на официальном
сайте <http://www.stgau.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2014 года и размещен на сайтах:
ВАК Минобразования и науки РФ <http://vak.ed.gov.ru> « ____ » _____ 2014 г.
ФГБОУ ВПО «Ставропольский ГАУ»: <http://www.stgau.ru> « ____ » _____ 2014 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета



Дьяченко Юлия Васильевна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности тематики исследований. Питание - один из важнейших факторов, определяющих состояние здоровья человека, обеспечивающих полноценную репродуктивную функцию, адаптационные возможности организма, работоспособность и продолжительность жизни (Бутко М.П., 1994).

По данным многих ученых, фактически здоровье человека на 60-70% зависит от питания, его структуры, безопасности и качества потребляемых пищевых продуктов, большую часть которых составляют продукты животного происхождения. Они являются основным источником наиболее дефицитных полноценных белков и других необходимых питательных веществ для человека. Однако с продуктами животного происхождения в организм человека могут попадать возбудители инфекционных заболеваний, а так же продукты их жизнедеятельности (токсины, ферменты), которые не редко могут приводить к местным и общим патологическим процессам на клеточном, молекулярном и на органном уровне (Асонов Н.Р., 2001).

В большинстве стран мира на протяжении истекших десятилетий зарегистрировано значительное увеличение распространенности заболеваний, вызываемых микроорганизмами, контаминирующими продукты питания и сырье животного происхождения (Касюк В.И., 1993).

По статистике количество заболеваний, связанных с некачественными продуктами растет из года в год, а по данным Департамента ветеринарии, процент положительных результатов бактериологических экспертиз продуктов животного происхождения также все еще остается высоким. В силу этого обеспечение безопасности пищевых продуктов и продовольственного сырья является приоритетной задачей современной науки и практики (Драчева Л.В., 2007, Забодалова Л.А., 2009).

Разрушение промышленных технологий в животноводстве, разукрупнение животноводческих хозяйств, свобода межрегиональных и межгосударственных перемещений животных, продуктов их убоя и формирование продовольственного рынка России за счет импорта сырья и продуктов животного происхождения, отрицательно отражается на эффективности традиционных схем исследования продукции животноводства и ее качестве (Аганин А.В., 2002). Традиционные микробиологические методы, как правило, не обладают универсальностью и экспрессностью. Для проведения анализа часто требуется значительный расход питательных сред и реактивов. Чувствительность этих методов не всегда отвечает необходимым требованиям, для своего проведения они требуют значительных затрат времени и не позволяют давать быстрое заключение о качестве продуктов. Результаты бактериологического исследования поступают уже после регламентированного срока их реализации, что порой затрудняет оперативный контроль за качеством и безопасностью пищевой продукции (Дмитриева В.В., 1978). В этой связи, для обеспечения качественного микробиологического контроля и с целью недопущения употребления в пищу населением продуктов, контаминированных возбудителями опасных инфекций, назрела необходимость внедрения в практику лабораторных микробиологических анализов современных, ускоренных, высокочувствительных и специфичных экспресс-методов исследования пищевой продукции.

Уровень содержания микроорганизмов в пищевом сыре и продуктах питания в Ростовской области, оказывает огромное влияние на экологическую безопасность продукции животного происхождения, однако, этот вопрос остается недостаточно изученным. Это обстоятельство и послужило основанием для выполнения исследований и обобщения данных, касающихся содержания микроорганизмов в пищевых продуктах животного происхождения, находящихся в обороте на территории Ростовской области, а также необходимости совершенствования имеющихся методов бактериологических анализов, создания новых «экспресс-схем» исследования продукции животноводства, направленных на сокращение времени проведения анализа, его упрощение при одновременном увеличении надежности и легкости интерпретации полученных результатов, высокой чувствительности и специфичности.

Объект исследования: Пищевая продукция животного происхождения.

Предмет исследования: Традиционные и альтернативные методы микробиологического исследования продукции животноводства.

Цель исследования: Провести микробиологический мониторинг пищевой продукции животного происхождения, находящейся в обороте на территории Ростовской области и определить динамику выявления продукции, не отвечающей требованиям нормативной документации. Усовершенствовать существующие методы ветеринарно-санитарной экспертизы продукции животноводства и разработать новую схему микробиологического анализа с использованием альтернативных методов, позволяющую в короткие сроки получать данные, касающиеся содержания в продукции регламентируемых микроорганизмов.

Для реализации намеченных целей поставлены следующие задачи:

1. Выполнить исследования и обобщить данные, касающиеся содержания микроорганизмов в пищевой продукции животного происхождения, находящейся в обороте на территории Ростовской области.

2. Установить уровень контаминации продукции животноводства отдельными видами регламентируемых микроорганизмов, потенциально опасными для потребителей.

3. Дать оценку пищевой продукции животного происхождения по содержанию отдельных групп микроорганизмов.

4. Определить годовую динамику и территориальные границы выявления продукции, не отвечающей требованиям нормативной документации.

5. Провести анализ чувствительности и специфичности экспресс-тестов «Singlepath», иммуноферментного анализатора «Mini VIDAS» и автоматического анализатора для подсчета бактерий в продуктах питания «ТЕМПО».

6. Провести сравнительный анализ скорости и достоверности экспресс и классических методов исследований.

7. Разработать «экспресс-схему» микробиологического исследования продукции животноводства, позволяющую в короткие сроки дать заключение о качестве и безопасности исследуемой продукции.

Научная новизна. Впервые, на основании глубокого лабораторного скрининга, в сравнении и в динамике проведен мониторинг микробиологической безопасности продукции животноводства, находящейся в обороте на территории Ростовской области. Изучен уровень контаминации пищевой продукции животного происхождения различными видами микроорганизмов, потенциально опасными для потребителей.

Впервые проведен сравнительный анализ эффективности традиционной и «экспресс» схем микробиологического исследования пищевой продукции (с использованием экспресс - тестов «Singlepath», иммуноферментного анализатора «Mini VIDAS» и автоматического анализатора для подсчета бактерий в продуктах питания «ТЕМРО»). Установили, что традиционные методы микробиологического анализа трудоемки, малопроизводительны, а их чувствительность значительно ниже, чем альтернативных ускоренных методов исследования, отличающихся существенным сокращением сроков проведения анализа.

Полученные результаты являются научной базой для последующего проведения мониторинга микробиологической безопасности продукции животноводства в Ростовской области, а также усовершенствования и внедрения альтернативных методов исследований в микробиологических лабораториях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Заключается в установлении возможности практического применения схемы ускоренного микробиологического анализа продукции животноводства, показавшей высокую степень корреляции с классическим бактериологическим анализом и позволяющей существенно сократить сроки проведения испытаний, что позволяет оказать влияние на улучшение качества и безопасности пищевой продукции животного происхождения.

Методология и методы исследования: Методологическая основа представлена принципиально новым подходом к исследованию пищевой продукции животного происхождения, заключающимся в использовании альтернативных методов микробиологических анализов, что обеспечивает возможность быстрого получения объективных результатов исследований, при одновременном увеличении надежности и легкости интерпретации полученных результатов, высокой чувствительности и специфичности. В работе применен комплекс методов: бактериологические, биохимические, серологические, а также методы анализа, сопоставления и статистики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экспресс - схема микробиологического исследования продукции животноводства, позволяет существенно сократить время проведения анализа, при одновременном увеличении надежности и легкости интерпретации полученных результатов, высокой чувствительности и специфичности.

2. Оценка качества и безопасности пищевой продукции животного происхождения, находящейся в обороте на территории Ростовской области:

- динамика выявления положительных проб по видам пищевой продукции, по показателям и группам микроорганизмов;

- определение годовой динамики выявления проб пищевой продукции, не отвечающей требованиям нормативной документации.

Апробация работы. Результаты исследований и основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседаниях кафедры микробиологии, вирусологии и патанатомии Донского государственного аграрного университета в 2011-2014 гг.; на межрегиональной конференции ветеринарных врачей «Отбор проб и лабораторные исследования пищевой продукции» (Цимлянск, 2013); на Международной научно-практической конференции «Инновационные пути развития АПК: проблемы и перспективы» (Персиановский, 2013).

Реализация результатов исследований. Предложенный метод ускоренной индикации микроорганизмов, внедрен в испытательном центре ФГБУ «Ростовский

референтный центр Россельхознадзора». Результаты выполненных исследований используются при чтении курса лекций по микробиологии. Материалы диссертационной работы могут служить источником информации при проведении совещаний, касающихся ветеринарно-санитарной экспертизы в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе четыре в изданиях, входящих в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ.

Личный вклад. Представленные в диссертационной работе экспериментальные исследования, теоретический и практический анализ полученных результатов проведены автором самостоятельно.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 235 страницах компьютерного текста (Microsoft Word) и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, заключения, выводы и предложения, список литературы и приложения. Работа иллюстрирована 96 рисунками (диаграммы, схемы, фотографии) и 21 таблицей. Список литературы включает 212 источников, в том числе 51 иностранных авторов.

2. Собственные исследования

2.1. Материалы и методы исследования.

Исследования по диссертационной работе выполнялись с 2011 по 2013 гг. на кафедре микробиологии, вирусологии и патанатомии ФГБОУ ВПО «Донской государственный аграрный университет» и в испытательном центре ФГБУ «Ростовский референтный центр Россельхознадзора». Объем проведенных исследований представлен в таблице 1.

Таблица 1- Объем проведенных исследований в период с 2011 по 2013 гг.

	Мясо и мясная продукция	Молоко и молочная продукция	Рыба и рыбная продукция	Яйцо и яичепродукты	ИТОГО
Исследовано проб	1552	1446	377	94	3469
По показателям:					
КМАФАнМ	1191	1036	374	94	2695
БГКП	1144	409	361	87	2001
Salmonella	1503	906	357	78	2844
L.monocytogenes	1348	66	281	0	1695
S.aureus	442	313	275	10	1040
E.coli	65	0	0	0	65
СРК	475	0	66	0	541
Плесени и дрожжи	116	120	92	0	328
V. parahaemolyticus	0	0	89	0	89
Соматические клетки	0	820	0	0	820
Ингибирующие вещества	0	855	0	0	855
ИТОГО исследований	6284	4525	1895	269	12973

В ходе проведения работы исследовано 3469 проб пищевой продукции животного происхождения, из них мяса и мясной продукции-1552 пробы, молока и молочной продукции - 1446 проб, рыбы, рыбной продукции и нерыбных объектов промысла – 377 проб, яиц и яйцепродуктов – 94 пробы.

Проведено 12973 исследования, в том числе мяса и мясной продукции- 6284, молока и молочной продукции - 4525, рыбы, рыбной продукции и нерыбных объектов промысла – 1895, яиц и яйцепродуктов - 269.

Исследования проводились по следующим микробиологическим показателям: КМАФАнМ – 2695 проб, БГКП – 2001 проба, Salmonella - 2844 пробы, Listeria monocytogenes - 1695, Staphylococcus aureus - 1040, Escherihia coli - 65 проб, сульфитредуцирующие клостридии - 541, плесени и дрожжи – 328, соматические клетки - 820, ингибирующие вещества - 855, Vibrio parahaemolitycus - 89 проб.

Нормативные значения на определение выше перечисленных показателей устанавливали согласно СанПиН 2.3.2.1078-01, Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) утв. решением комиссии таможенного союза № 229 от 28.05.2010 г и ФЗ № 88 «Технический регламент на молоко и молочную продукцию».

Отбор проб конкретных видов пищевых продуктов проведен согласно следующим ГОСТам: ГОСТ 26668-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологического анализа»; ГОСТ 21237-75 «Мясо. Методы бактериологического анализа»; ГОСТ 50396.0-92 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовки к микробиологическим исследованиям»; ГОСТ 26809-86 «Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб к анализу»; ГОСТ Р 54004-2010 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний».

Подготовка проб к испытанию по микробиологическим показателям проведена в соответствии с требованиями ГОСТа 26669-87 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологического анализа».

При оценке качества продуктов животноводства учитывали уровень их бактериального обсеменения (КМАФАнМ) путем посева определенного разведения навески продукта в мясо-пептонный агар согласно ГОСТ 10444.15-94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов» и ГОСТ Р 53430-2009 «Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа».

Также определяли наличие бактерий группы кишечной палочки по ГОСТ Р 52816-2007 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)» и ГОСТ Р 53430-2009 «Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа», используя среду Кесслер. С целью выделения чистой культуры БГКП использовали среду Эндо. Способность ферментировать лактозу определяли с помощью среды Гисса с лактозой.

Степень и уровень распространения в пищевой продукции животного происхождения бактерий Listeria monocytogenes проводили согласно ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes», который предусматривает использование сред накопления – ПБЛ 1 (бульон Фрайзера I) и ПБЛ 2 (бульон Фрайзера II).

С целью выявления характерных колоний на агаризованных селективно-диагностических средах применяли питательный агар для листерий (ПАЛ) и ПАЛКАМ агар. Для определения принадлежности характерных колоний к бактериям рода *Listeria* использовали мясо-пептонный агар с 1% глюкозы и полужидкую питательную среду. С целью определения ферментативных свойств применяли среды Гисса с маннитом, ксилозой, маннозой и рамнозой. β -гемолитическую активность проверяли путем посева культуры на кровяной агар. Лецитиназную активность на средах с активированным углем и без него, а также дополнительно проводили идентификацию *Listeria monocytogenes* путем постановки реакции агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой.

Выделение бактерий рода *Salmonella* проводили согласно ГОСТ Р 52814- 2007 (ИСО 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*», который предусматривает использование сред накопления-забуференную пептонную воду, RVS-бульон, а также дифференциально-диагностические среды - XLD-агар, висмут-сульфит агар, Плоскирева, Эндо. С целью подтверждения принадлежности изучаемой культуры к бактериям рода *Salmonella* использовали среду Олькеницкого, агар Кристенсена с мочевиной, бульон Кларка, бульон Хоттингера, полужидкий агар, среды Гисса с маннитом, сахарозой, лактозой и глюкозой. Для проведения серологической идентификации использовали агглютинирующие адсорбированные поливалентные сальмонеллезные О-сыворотки основных групп А,В,С,Д,Е, а затем, если не выявлено О-антигенов с сыворотками основных групп, ставили реакцию с сыворотками редких групп. После этого проводили реакцию агглютинации с Н-сыворотками. При этом вначале использовали Н-сыворотки, соответствующие Н-антигенам 1 фазы, а потом Н-антигенам 2 фазы.

Исследование пищевой продукции на наличие *Staphylococcus aureus* проводили классическим методом согласно ГОСТ Р 52815-2007 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*» и ГОСТ 30347-97 «Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*», используя в качестве селективной среды солевой бульон (6,5% NaCl), диагностических сред – желточно-солевой агар и Байрд-Паркер агар. В качестве основных критериев патогенности изучали способность стафилококков коагулировать цитратную плазму крови кролика, проявлять лецитиназную активность и ферментировать маннит.

Для выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli* согласно ГОСТ 30726-2001 «Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*» использовали жидкую селективную среду с лактозой, среду Эндо, бульон Хоттингера, бульон Кларка, трехсахарный агар, среду Симмонса, среды Гисса с сорбитом, глюкозой и лактозой.

Количество дрожжей и плесневых грибов определяли согласно ГОСТ 10444.12-88 «Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов», основанный на высеве продукта или гомогената продукта и (или) их разведений в чашки Петри с последующей заливкой агаром Сабуро.

С целью проведения сравнительной оценки эффективности обнаружения в пищевой продукции микроорганизмов классическими и экспресс - методами анализа, использовали автоматический анализатор для подсчета бактерий в продуктах питания «ТЕМРО», иммуноферментный анализатор «Mini VIDAS» и экспресс - тесты «Singlepath». Исследования проводили согласно ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*», МР

02.031-08 «Сырье и продукты пищевые. Количественный микробиологический анализ пищевых продуктов НВЧ-методом при использовании автоматического анализатора ТЕМРО», МР 11-3/278-09 «Методы всявления бактерий рода Salmonella с использованием анализатора Vidas/mini Vidas», МР № 24 ФЦ/976 «Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Merck».

3. Результаты исследований

3.1. Анализ динамики выявления продукции, не отвечающей требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм, проведенный в период с 2011 по 2013 гг. представлен в таблице 2.

Таблица 2 -Динамика выявления пищевой продукции не соответствующей требованиям нормативной документации

Вид исследования	Исследовани й	Из них положительных	% Выявления
КМАФАнМ	2695	222	8,2
БГКП	2001	137	6,8
Salmonella	2844	3	0,1
L.monocytogenes	1695	0	0
S.aureus	1040	9	0,9
E.coli	65	8	12,3
СРК	541	5	0,9
Плесени и дрожжи	328	25	7,6
V.parahaemolyticus	89	0	0
Соматические клетки	820	1	0,1
Ингибирующие вещества	855	0	0
ИТОГО проб	3460	353	10,2
Итого исследований	12973	410	3,1

За анализируемый период по показателю КМАФАнМ исследовано 2695 проб пищевой продукции, 222 из них не соответствовали требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм (8,2 %). На наличие бактерий группы кишечных палочек исследована 2001 проба пищевой продукции животного происхождения. Из них 137 проб содержали завышенное количество бактерий названной группы, что в процентном отношении составило 6,8 %. На содержание бактерий рода Salmonella исследовано 2844 проб пищевой продукции животного происхождения, три из них положительные (0,1 %). На соответствие требованиям нормативной документации по показателю Listeria monocytogenes исследовано 1695 проб пищевой продукции животного происхождения. Положительных проб не выявлено. Staphylococcus aureus обнаружен в 9 пробах пищевой продукции из 1040 исследованных (0,9 %). Из 65 проб исследованных на наличие бактерий Esherihia coli, восемь оказались положительными, что в процентном отношении составило 12,3 %. На наличие допустимого количества сульфитредуцирующих кластридий исследована 541 проба, 5 из них оказались недоброкачественными, что в процентном отношении составило 0,9 %. Не допустимое количество плесеней и дрожжей обнаружено в 25 пробах

пищевой продукции из 328 исследованных (7,6 %). Рыбы, рыбной продукции и нерыбных объектов промысла по показателю *Vibrio parahaemolyticus* исследовано 89 проб, не соответствующих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм не обнаружено. На содержание соматических клеток и ингибирующих веществ исследовано, соответственно 820 и 855 проб молока и молочной продукции. Проб не соответствующих требованиям нормативной документации по показателю ингибирующие вещества не зарегистрировано, по показателю соматические клетки обнаружена одна положительная проба.

Итого за период с 2011 по 2013 гг. исследовано 3469 проб пищевой продукции. Обнаружено 353 пробы, не отвечающие требованиям нормативной документации. Из них в 2011 г 185 из 1597 исследованных (11,6%), в 2012 г 102 из 646 исследованных проб (15,8%), в 2013 году соответственно 66 из 1217 (5,4 %). В общем, процент выявления проб пищевой продукции не отвечающих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм составил 10,2 %.

За три года проведено 12973 исследования. Получено 410 положительных результатов анализов, что составило 3,1 % от всех проведенных испытаний. Так в 2011 году проведено 5987 исследований, 207 из них положительные (3,5 %). В 2012 году из 2757 проведенных исследований, получено 128 положительных, что в процентном отношении составило 4,5 %. В 2013 году эти показатели составили соответственно 4229 и 75 (1,8 %).

3.2. Динамика выявления положительных проб по видам пищевой продукции

Изучив процентное соотношение обнаружения проб, не соответствующих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм, по различным видам пищевой продукции установили, что в 2011 году обнаружено 77 проб мяса и мясной продукции, не отвечающей требованиям нормативной документации, в 2012 – 64, а в 2013 – 34. Всего за анализируемый период зарегистрировано 175 проб не доброкачественной мясной продукции и сырья (49,6 %). Положительных проб молока и молочной продукции обнаружено 138 (39,0 %), из них в 2011 г - 84, 2012 г – 27, в 2013 г -27. Проб рыбы, рыбной продукции и нерыбных объектов промысла, не отвечающей требованиям СанПиН 2.3.1078-01 в 2011 году обнаружено 23, в 2012 – 7, в 2013 г - 5. Всего выявлено 35 образцов, что в процентном соотношении составило 10,0 %. Также за анализируемый период обнаружено 5 положительных образцов яиц и яйцепродуктов (1,4%), из них одна в 2011 г и четыре в 2012 году (таблица 3).

Таблица 3 - Выявление проб продукции животного происхождения, не соответствующих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по видам продукции

Вид продукции	Годы			ИТОГО	
	2011	2012	2013	Проб	%
Мясо и мясная продукция	77	64	34	175	49,6
Молоко и молочная продукция	84	27	27	138	39,0
Рыба и рыбная продукция	23	7	5	35	10,0
Яйцо и яйцепродукты	1	4	4	5	1,4
ИТОГО	185	102	66	353	100

Таким образом, по количеству проб продукции животноводства, не отвечающей требованиям нормативной документации, мясо и мясная продукция занимает доминирующую позицию по отношению к остальным видам пищевой продукции, и в процентном отношении составляет 49,6 %; молоко и молочная продукция 39,0 %; рыба, рыбная продукция и нерыбные объекты промысла-10,0 %; яйцо и яйцепродукты составили 1,4% (рисунок 1).



Рисунок 1 - Выявление проб продукции животного происхождения, не отвечающих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по видам продукции

3.2. Выявление не доброкачественной продукции по нормируемым показателям

Изучив, наиболее детально количество недоброкачественной продукции по каждому нормированному показателю в 2011, 2012 и 2013 годах и установили процентное соотношение каждого отдельного показателя к общему числу обнаружений (таблица 4).

Таблица 4 - Выявление продукции животного происхождения, не соответствующих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по показателям

Показатель	Годы			ИТОГО	
	2011	2012	2013	Проб	%
1	2	3	4	5	6
КМАФАнМ	129	49	44	222	54,1
БГКП	72	42	23	137	33,4
Salmonella	2	1	0	3	0,7
Listeria monocytogenes	0	0	0	0	0
Staphylococcus aureus	3	6	0	9	2,2
Esherihia coli	0	8	0	8	1,9
СРК	0	4	1	5	1,2
Плесени и дрожжи	1	18	6	25	6,1
Vibrio parahaemolyticus	0	0	0	0	0
Соматические клетки	0	0	1	1	0
Ингибирующие вещ-ва	0	0	0	0	0
ИТОГО	207	128	75	410	100

При анализе таблицы 4 видно, что наибольший процент выявлений приходится на группу санитарно-показательных микроорганизмов. Из них проб не соответствующих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по КМАФАнМ в 2011 году обнаружено 129, в 2012 году - 49 проб и в 2013 соответственно 44. Всего за три года по показателю КМАФАнМ выявлено 222 пробы недоброкачественной продукции, что в процентном отношении составило 54,1 %.

По наличию бактерий группы кишечных палочек в 2011 году 72 пробы признано недоброкачественными, в 2012 - 42, в 2013 году в 23 пробах обнаружено недопустимое количество микроорганизмов этой группы. Всего за период с 2011 по 2013 год обнаружено 137 проб пищевой продукции животного происхождения не соответствующей требованиям нормативной документации по показателю БГКП, что по отношению к общему количеству выявлений проб недоброкачественной продукции составляет 33,4 %. Патогенные бактерии рода *Salmonella* обнаружены лишь в двух пробах в 2011 году и в одной пробе в 2012 году, что в процентном отношении составило 0,7 %. Патогенные микроорганизмы рода *Listeria monocytogenes* за три года исследований не обнаружены.

По показателю *Staphylococcus aureus* в 2011 году обнаружено три положительные пробы, в 2012 шесть проб. Всего за три года по данному показателю выделено 9 проб (2,2%) продукции не соответствующей требованиям нормативной документации.

Условно-патогенные бактерии *Esheria coli* обнаружены в 2012 году в восьми пробах, что по отношению к общему количеству проб пищевой продукции не соответствующих требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 составило 1,9 %.

Сульфитредуцирующие клостридии в 2012 и 2013 годах обнаружены в четырех и одной пробах соответственно. Всего за три года процент выявления проб пищевой продукции, не отвечающей требованиям ветеринарно - санитарных правил и норм по данному показателю составил 1,2 % (5 проб).

По показателю порчи плесени и дрожжи в 2011 году обнаружена одна положительная проба, в 2012 – 18 , в 2013 году - 6. Всего в период с 2011 по 2013 год по содержанию плесеней и дрожжей обнаружено 25 недоброкачественных проб, что составляет в процентном отношении 6,1 %.

Завышенное количество соматических клеток обнаружено в одной пробе в 2013 году (0,2%). Проб не соответствующих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по показателям *Vibrio parahaemolyticus* и ингибирующие вещества не зарегистрировано (рисунок 2).

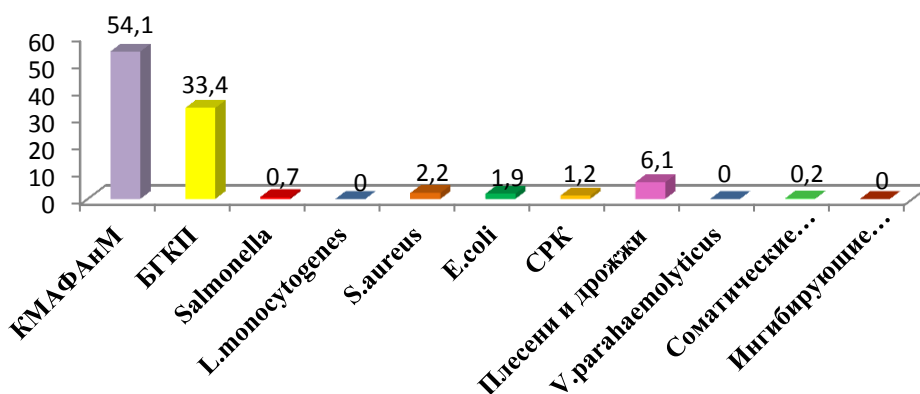


Рисунок 2 - Выявление проб продукции животного происхождения, не отвечающих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по показателям

3.3. Выявление не доброкачественной продукции по группам микроорганизмов

Проведя ретроспективный анализ уровня обсеменения пищевой продукции животного происхождения, мы распределили выявленные микроорганизмы на 4 группы: санитарно-показательные (КМАФАнМ, БГКП); условно - патогенные микроорганизмы (*E.coli*, *S.aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, бактерии рода *Proteus*, сульфитредуцирующие клостридии); патогенные микроорганизмы (бактерии рода *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); микроорганизмы порчи (дрожжи, плесневые грибы) (таблица 5).

Таблица 5 - Выявление проб продукции животного происхождения, не соответствующих требованиям нормативной документации по группам микроорганизмов

Группа микроорганизмов	Годы			ИТОГО	
	2011	2012	2013	Проб	%
Санитарно-показательные	201	91	68	360	87,8
Условно-патогенные	3	18	1	22	5,4
Патогенные	2	1	0	3	0,7
Микроорганизмы порчи	1	18	6	25	6,1
ИТОГО	207	128	75	410	100

Изучив удельный вес каждой отдельной группы в сравнительном аспекте и в динамике по количеству всех обнаруженных микроорганизмов, установили, что за анализируемый период 360 проб пищевой продукции животного происхождения, не соответствовали требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по наличию санитарно - показательных микроорганизмов, условно - патогенных – 22, три по наличию патогенных и 25 проб оказались не доброкачественными по недопустимому количеству микроорганизмов порчи.

Таким образом, при анализе данных обсемененности пищевой продукции животного происхождения микроорганизмами установлено, что наибольшее число обнаруженных микроорганизмов относилось к группе санитарно-показательных (87,8 %). Условно - патогенные микроорганизмы составили 5,4 %. Микроорганизмы порчи - 6,1 %. Группа патогенных микроорганизмов оказалась самой малочисленной и составила всего 0,7 %. Это на наш взгляд связано с тем, что процент непосредственного выделения из пищевой продукции патогенных микроорганизмов значительно ниже в связи с очень малым количеством этих микроорганизмов по сравнению с сапрофитной микрофлорой (рисунок 3).

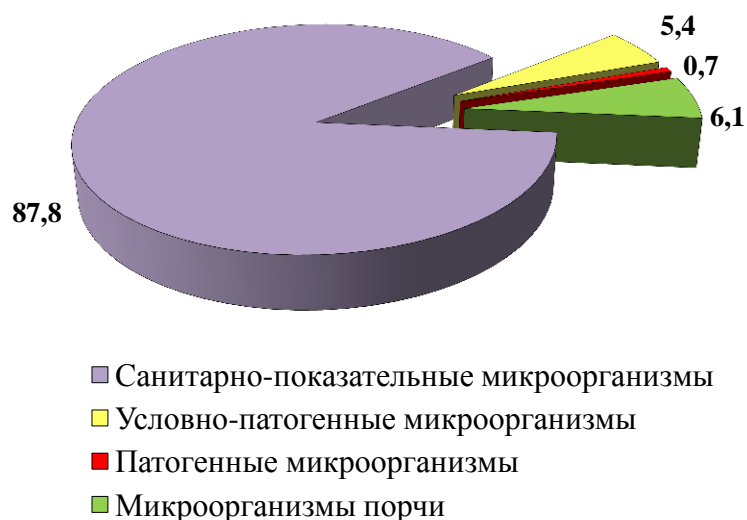


Рисунок 3 - Выявление проб продукции животного происхождения, не отвечающих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по группам микроорганизмов

3.4. Обнаружение проб пищевой продукции животного происхождения, не отвечающей требованиям нормативной документации в районах Ростовской области

Проанализировав случаи регистрации обнаружения проб пищевой продукции животного происхождения, не отвечающей требованиям нормативной документации в районах Ростовской области за период 2011-2013 гг. установили, что наибольший процент выявления недоброкачественной продукции приходится на Матвеево-Курганский район (12,5 %).

На второй позиции находится Обливский (7,9 %), на третьей Октябрьский (7,5 %) районы. Далее следуют Неклиновский (6,2 %) и Морозовский районы (5,7 %), г. Таганрог (5,0 %), Орловский (5,0 %), Сальский (4,8 %), Миллеровский и Зимовниковский районы по 4,1%, г. Ростов-на-Дону (2,6 %), Каменский, Песчанокопский, Шолоховский и Пролетарский районы соответственно по 2,4 %, Чертковский, Красносулинский и Тарасовский районы по 1,9%, Аксайский, Веселовский, Егорлыкский, Радионово-Несветаевский и Мясниковский районы по 1,6 %, Целинский район–1,4%.

На остальные районы пришлось 2,5 % обнаружений.

3.5. Годовая динамика выявления проб пищевой продукции, не отвечающей требованиям нормативной документации

Основываясь на данных, полученных в испытательном центре, проанализировали годовую динамику выявления пищевой продукции животного происхождения не отвечающей требованиям нормативной документации за три года (таблица б).

Таблица 6 - Годовая динамика выявления продукции, не отвечающей требованиям нормативной документации по месяцам за 2011-2013 гг.

Месяц	2011	2012	2013	Всего	%
Январь	3	1	1	5	1,4
Февраль	8	5	2	15	4,2
Март	10	7	1	18	5,0
Апрель	14	7	3	24	6,8
Май	18	10	7	35	9,9
Июнь	23	15	12	50	14,2
Июль	36	20	12	68	19,3
Август	34	17	13	64	18,1
Сентябрь	21	14	8	43	12,2
Октябрь	10	3	4	17	4,8
Ноябрь	5	1	2	8	2,3
Декабрь	3	2	1	6	1,7
Итого:	185	102	66	353	100

Из материалов, представленных в таблице 6 видно, что большинство случаев обнаружения не доброкачественной продукции приходится на период с мая по сентябрь (73,7 %), с пиком в июле (19,3 %) от всех случаев выявления пищевой продукции не соответствующей требованиям нормативной документации. По нашему мнению, это связано, прежде всего, с тем, что в этот период климатические условия наиболее благоприятны для размножения микроорганизмов. Поэтому ненадлежащие условия транспортирования, хранения и реализации пищевой продукции животного происхождения приводят к её скорой порче.

На оставшиеся 9 месяцев (с сентября по май) приходится 26,3 % зарегистрированных случаев выявления проб пищевой продукции, не соответствующей требованиям нормативной документации (рисунок 4).

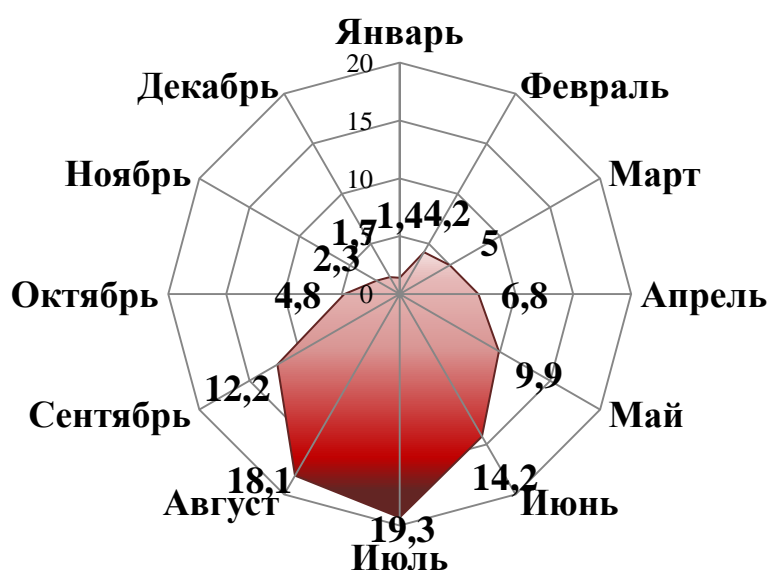


Рисунок 4 - Годовая динамика выявления проб пищевой продукции, не отвечающей требованиям нормативной документации

3.6. Сравнительная характеристика традиционной и альтернативной схем микробиологического исследования пищевой продукции

С целью проведения сравнительной оценки эффективности альтернативных и классических методов выявления микроорганизмов в пищевой продукции, нами испытаны экспресс-тесты «Singlepath», автоматический иммуноферментный анализатор «Mini VIDAS» и автоматический анализатор для подсчета бактерий «ТЕМРО».

В качестве материала исследований использовали 30 искусственно контаминированных образцов сухого молока, каждый из которых исследовался в трех параллелях различными методами. Для этого тестовые культуры микроорганизмов пересеивали на поверхность скошенного питательного агара. На следующий день, из полученных агаровых культур готовили суспензии тестовых штаммов в стерильном разбавителе и контаминировали пробы сухого молока. Результаты исследований представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Выявление положительных проб по традиционной и «экспресс» схемам исследований

Анализируемый показатель	Традиционная схема	«Экспресс» схема с использованием:		
		«Mini Vidas»	«Singlepath»	«ТЕМРО»
	№ пробы	№ пробы	№ пробы	№ пробы
КМАФАнМ	1,7,12,23,28	Не тестируется	Не тестируется	7,12,23,28
БГКП	3,5,9,11,16,26	Не тестируется	Не тестируется	3,5,9,11,16,26
Salmonella	2,15,27	2,15,22,27	2,15,22,27	Не тестируется
L.monocytogenes	4	4	4	Не тестируется
S. aureus	10,13,17,20,29	Не тестируется	Не тестируется	10,13,17,20,29
E. coli	5,9,11	Не тестируется	Не тестируется	5,9,11,16
Плесени и дрожжи	6,14,18,21	Не тестируется	Не тестируется	6,14,18,21

На первом этапе скрининга с использованием классических методов исследований из 30 исследуемых образцов КМАФАнМ обнаружено в пяти образцах. В шести пробах обнаружены БГКП, в пяти - S.aureus. В четырех дрожжи и плесневые грибы. Бактерии рода Salmonella обнаружены в трех пробах. Listeria monocytogenes в одном, а E.coli в трех образцах.

При проведении иммунохроматографического анализа с использованием тестов «Singlepath» бактерии рода Salmonella обнаружены в четырех пробах, Listeria monocytogenes в одной. Такие же результаты получены на иммуноферментном анализаторе «Mini Vidas».

По результатам анализа с использованием автоматического анализатора для подсчета бактерий «ТЕМРО» КМАФАнМ обнаружено в четырех образцах, БГКП в шести, E. coli в четырех, Staphylococcus aureus в пяти, дрожжи и плесневые грибы зарегистрированы в четырех из 30 исследованных образцов.

Таким образом, при проведении исследований эталонным и альтернативными методами в двух случаях (Salmonella, E. coli) имело место положительное отклонение (когда альтернативный метод даёт положительный результат, в то время как

эталонный метод даёт отрицательный результат) и в одном случае (КМАФАнМ) имело место отрицательное отклонение (когда альтернативный метод даёт отрицательный результат, в то время как эталонный метод даёт положительный результат).

С целью установления относительной точности (степени соответствия между результатом, полученным эталонным методом и результатом, полученным альтернативным методом, при исследовании идентичных образцов) экспресс - анализы все результаты, полученные с использованием иммуноферментного анализатора «Mini VIDAS», экспресс-тестов «Singlepath» и автоматического анализатора для подсчета бактерий в продуктах питания «ТЕМРО», были дополнительно подтверждены классическими методами исследований согласно ГОСТам с проведением дополнительной биохимической и серологической идентификации.

В ходе исследования имела место полная корреляция положительных результатов полученных при помощи анализаторов «Mini VIDAS», «ТЕМРО» и экспресс тестов «Singlepath» с классическими методами. Таким образом, установлено, что альтернативные методы исследований обладают высокой степенью относительной специфичности (способностью альтернативного метода не обнаруживать микроорганизм тогда же, когда его не обнаруживает эталонный метод) и относительной чувствительности (способностью альтернативного метода обнаруживать микроорганизм тогда же, когда его обнаруживает эталонный метод).

Кроме того, установлена высокая специфичность альтернативных методов исследований, т.е. способность метода точно обнаруживать данный анализит или измерять его количество в образце, без интерференции со стороны нецелевых компонентов.

Сравнительная характеристика экспресс и классических методов исследований представлена в таблице 8.

Таблица 8 - Сравнительная характеристика экспресс и классических методов исследований

Метод исследования	Анализируемый показатель	Кол-во образцов	Результат исследования		Длительность исследования (дней)	
			-	+	-	+
Классический метод	Salmonella	30	27	3	3	6
	Listeria monocytogenes	30	29	1	5	8-14
	КМАФАнМ	30	25	5	3	3
	БГКП	30	24	6	1	4
	S. aureus	30	25	5	3	7
	E. coli	30	27	3	2	7
	Плесени и дрожжи	30	26	4	5	5
Mini Vidas	Salmonella	30	26	4	1	1
	Listeria monocytogenes	30	29	1	2	2
Singlepath	Salmonella	30	26	4	2	2
	Listeria monocytogenes	30	29	1	2	2
ТЕМРО	КМАФАнМ	30	26	4	2	2
	БГКП	30	24	6	1	1
	S. aureus	30	25	5	1	1
	E. coli	30	26	4	1	1
	Плесени и дрожжи	30	26	4	3	3

Согласно данным, представленным в таблице чувствительность классического метода оказалась значительно ниже, чем альтернативных экспресс-анализов. По нашему мнению это связано с большим количеством погрешностей в проведении исследований с использованием классического метода, к которым можно отнести качество приготовления питательных сред и реактивов, соблюдение точного температурного режима при инкубировании микроорганизмов, уровень перекрестной контаминации, человеческий фактор, так как многое зависит от уровня подготовки специалиста, проводящего исследование и многих других факторов.

Использование экспресс - анализов для лабораторной практики представляет большой интерес. К достоинствам этих методов следует отнести их высокую чувствительность и специфичность, кроме того их использование существенно сокращает число этапов исследования, расход питательных сред, трудозатраты, практически сводит к нулю уровень перекрестной контаминации, сокращает время проведения анализа, что актуально для лабораторий контролирующих качество продовольственного сырья и продукции животноводства и позволяет в короткие сроки провести скрининговые исследования пищевой продукции животного происхождения.

Учитывая вышеизложенное, следует признать, что внедрение в практику ветеринарно-санитарной экспертизы ускоренных, высокочувствительных и специфичных экспресс - анализов, является одной из мер, обеспечивающей выпуск качественной и безопасной продукции.

4. Выводы

1. При изучении динамики выявления продукции, не отвечающей требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм в 2011 году исследовано 1597 проб пищевой продукции (проведено 5987 исследований), 185 проб положительные (11,6 %). В 2012 году из 646 проб (2757 испытаний), оказались недоброкачественными 102, что в процентном отношении составило 15,8 %. Из 1217 исследованных в 2013 году проб пищевой продукции (4229 исследования), положительными были 66 (5,4 %). Всего в период 2011-2013 гг. исследовано 3469 проб пищевой продукции животного происхождения. Из этого числа выделено 353 пробы, не отвечающие требованиям нормативной документации. В общем, процент выявления проб пищевой продукции не отвечающих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм составил 10,2 %.

2. Изучив процентное отношение обнаружения проб, не соответствующих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм, по различным видам пищевой продукции установили, что за анализируемый период зарегистрировано 175 проб не доброкачественной мясной продукции и сырья (49,6 %). Положительных проб молока и молочной продукции обнаружено 138 образцов (39,0 %). Рыбы, рыбной продукции и нерыбных объектов промысла - 35 образцов, что в процентном отношении составило 10,0 %. Также за анализируемый период обнаружено 5 образцов яйца и яйцепродуктов (1,4 %) не отвечающих требованиям СанПиН 2.3.1078-01. Таким образом, по количеству проб пищевой продукции животного происхождения, не отвечающей требованиям нормативной документации, доминирующую позицию по отношению к остальным видам занимает, мясо и мясная продукция.

3. Изучив количество недоброкачественной продукции по каждому нормированному показателю, установили процентное отношение каждого отдельного

показателя к общему числу обнаружений. Так количество положительных образцов по показателю КМАФАнМ составило 54,1 %; БГКП – 33,4 %; Salmonella - 0,7 %; Staphylococcus aureus 2,2 %; Esherihia coli – 1,9 %; сульфитредуцирующие клостридии - 1,2 %; плесени и дрожжи – 6,1 %; соматические клетки – 0,2 %. Проб не соответствующих требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по показателям Listeria monocytogenes, Vibrio parahaemolyticus и ингибирующие вещества не обнаружено.

4. Проведя ретроспективный анализ уровня обсеменения пищевой продукции животного происхождения и распределив выявленные микроорганизмы на 4 группы: - санитарно-показательные (КМАФАнМ, БГКП); условно - патогенные микроорганизмы (E.coli, S.aureus, Vibrio parahaemolyticus, бактерии рода Proteus, сульфитредуцирующие клостридии); патогенные микроорганизмы (Salmonella, Listeria monocytogenes); микроорганизмы порчи (дрожжи, плесневые грибы), определили удельный вес каждой отдельной группы в сравнительном аспекте и в динамике по количеству всех обнаруженных микроорганизмов.

Так 360 проб (87,8 %) пищевой продукции животного происхождения, не соответствовали требованиям ветеринарно-санитарных правил и норм по наличию санитарно-показательных микроорганизмов, условно-патогенных – 22 (5,4 %), три по наличию патогенных (0,7 %) и 25 проб оказались не доброкачественными по завышенному количеству микроорганизмов порчи (6,1%).

Таким образом, группа патогенных микроорганизмов оказалась самой малочисленной и составила всего 0,7 %. Это на наш взгляд связано с тем, что процент непосредственного выделения из пищевой продукции патогенных микроорганизмов значительно ниже в связи с очень малым количеством этих микроорганизмов по сравнению с сапрофитной микрофлорой.

5. Установлено, что большинство случаев обнаружения не доброкачественной продукции приходится на период с мая по сентябрь (73,7 %), с пиком в июле (19,3 %) от всех случаев выявления пищевой продукции не соответствующей требованиям нормативной документации. Мы считаем, что данное обстоятельство связано с благоприятным для размножения микроорганизмов температурным режимом.

6. Предложенные альтернативные экспресс-методы исследования пищевой продукции показали высокую степень корреляции с классическим бактериологическим анализом, что свидетельствует об их высокой специфичности и чувствительности, позволяют сократить число этапов исследования, расход питательных сред, трудозатраты, практически свести к нулю уровень перекрестной контаминации, при одновременном увеличении надежности и легкости интерпретации полученных результатов.

Безусловным преимуществом данной схемы является возможность быстрого получения объективных результатов исследований и сокращение времени проведения анализа.

5. Практическое использование результатов исследований

На основании полученных данных усовершенствована и активно внедряется в лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы новая схема микробиологического исследования пищевой продукции, позволяющая в короткие сроки дать заключение о ее качестве и безопасности. Предложенный метод ускоренной индикации микроорганизмов, содержащихся в пищевой продукции животного происхождения,

внедрен в испытательном центре ФГБУ «Ростовский референтный центр Россельхознадзора» и ГБУ РО «Ростовская областная ветеринарная лаборатория». Результаты исследований используются в учебном процессе на кафедре микробиологии, вирусологии и патанатомии ФГБОУ ВПО «Донской государственный аграрный университет».

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях

- 1. Чубенко, Н.В. Микробиологический контроль за качеством и безопасностью пищевой продукции / Н.В. Чубенко, Л.А. Малышева // Ветеринарная патология. – 2010. - Вып. № 4.– С. 92-96.**
- 2. Чубенко, Н.В. Применение ускоренных микробиологических методов для выявления патогенных микроорганизмов в пищевой продукции / Н.В. Чубенко, Л.А. Малышева // Ветеринарная патология. – 2011. - Вып. № 4.– С. 64-67.**
- 3. Чубенко, Н.В. Обеспечение качества и безопасности молока и молочной продукции / Н.В. Чубенко, Л.А. Малышева // Ветеринарная патология. – 2012. - Вып. № 1.– С. 135-139.**
- 4. Глазунова, Н.В. Экспресс-анализатор «ТЕМРО» в сфере контроля за качеством и безопасностью пищевой продукции / Н.В. Глазунова, Л.А. Малышева // Ветеринарная патология. – 2013. - Вып. № 3.– С. 78-81.**

Статьи в других научных изданиях

- 5. Глазунова, Н.В. Инновационные технологии в области обеспечения качества и безопасности пищевой продукции / Н.В. Глазунова, Л.А. Малышева // Инновационные пути развития АПК: проблемы и перспективы: материалы междунар. науч.- практ. конф. ДонГАУ.- Пос. Персиановский, 2013. – С. 173-176.**

ГЛАЗУНОВА
Надежда Владимировна

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО
КОНТРОЛЯ ЗА КАЧЕСТВОМ И БЕЗОПАСНОСТЬЮ ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Формат 60x84 1/16	Подписано в печать 15.10.2014	Уч.-изд. л. 0,7
Бумага офсетная	Усл. печ. л. 1,0	Тираж 120экз.
	Заказ №47-3736	

Отпечатано в Издательско-полиграфическом комплексе «Колорит»
346430, г. Новочеркасск, пр. Платовский 82 Е
тел: 8-918-518-04-29; 8-952-603-0-609